

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM



Биологические
и технические
мембраны

В.П.Скулачев

Энергетика биологических мембран



«Наука»



Серия
«Биологические
и технические
мембраны»

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
СЕКЦИЯ
ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

В. П. Скулачев

Энергетика биологических мембран



МОСКВА
«НАУКА»
1989

Энергетика биологических мембран / В. П. Скулачев. — М.: Наука, 1989. — 564 с. — ISBN 5-02-004027-4

Монография содержит обзор важнейших биоэнергетических механизмов, локализованных в мембранах. Рассмотрены мембранные системы фотосинтеза и внутриклеточного дыхания, поставляющие почти всю энергию, необходимую для жизнедеятельности организмов. Описаны пути использования накопленной мембранами энергии, такие, как синтез АТФ, аккумуляция химических веществ в клетках и органеллах, работа «моторов», приводящих в движение жгутики бактерий, образование тепла в целях терморегуляции и т. д. Изложена проблема кабельной функции внутриклеточных мембран, участвующих в транспорте энергии в масштабах клетки. Все эти аспекты даны применительно к живым системам различной степени сложности — от бактерии до растения, животных и человека.

Книга рассчитана на биоэнергетиков, биохимиков, биофизиков, молекулярных биологов, физиологов, фармакологов, микробиологов.

Табл. 17. Ил. 130. Библиогр.: 1656 назв.

Редакционная коллегия серии
«Биологические и технические мембраны»:

академик **Ю. А. ОВЧИННИКОВ** (ответственный редактор),
член-корреспондент АН СССР **Ю. А. ЧИЗМАДЖЕВ**
(зам. ответственного редактора),

академики **П. Г. КОСТЮК**, **А. М. УГОЛЕВ**,
М. М. ШУЛЬЦ, член-корреспондент АН СССР
Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН

Ответственный редактор
академик **С. Е. СЕВЕРИН**

Книга посвящена мембранным аспектам биоэнергетики, направлению, представляющему собой одну из «точек роста» физико-химической биологии. Развитие этой области в течение последних двух десятилетий шло столь стремительно, а дискуссии по ключевым ее проблемам были так бескомпромиссны, что появилась, как мне кажется, необходимость в спокойном подведении итогов. Нужно отделить твердо установленные факты от предположений и описать накопленную сумму знаний в рамках одной непротиворечивой концепции и единой терминологии.

Главная цель работы состояла в том, чтобы дать развернутый анализ этой области науки, и я надеюсь, что большинство явлений, так или иначе связанных с энергетикой биомембран, хотя бы упомянуты в книге и вошли в предметный указатель. В книге можно найти определение основных понятий и описание принципов специфических методов, используемых биоэнергетиками в своих исследованиях. Рассмотрены мембранные механизмы фотосинтеза и внутриклеточного дыхания, ответственные за получение почти всей энергии, обеспечивающей жизнедеятельность организмов. Описаны пути и способы использования накопленной энергии в биомембранах, такие, как синтез АТФ, транспорт и накопление метаболитов, работа «моторов», приводящих в движение жгутики бактерий, образование тепла в целях терморегуляции и т. д. Изложена проблема кабельной функции внутриклеточных мембран, участвующих в переносе энергии в масштабах клетки. Суммированы сведения о роли H^+ и Na^+ в качестве «сопрягающих» ионов, циркуляция которых между двумя разделенными мембраной отсеками обеспечивает взаимосвязь процессов освобождения и использования энергии. Поскольку все эти вопросы имеют универсальное значение для экономики живой клетки, рассматриваются живые системы различных уровней сложности — от бактерий до высших животных и человека.

В этой книге я адресуюсь как к специалистам-биоэнергетикам, так и к студентам, интересующимся механизмом одной из фундаментальных биологических функций — энергообеспечением живых систем.

В целом монография написана в стиле учебника. Однако некоторые разделы изложены более подробно, чем это принято в учебных пособиях. Таковы главы, посвященные новым многообещающим направлениям исследований. Детальнее других написаны разделы, так или иначе связанные с некоторыми работами нашей группы. В последнем случае я рассчитываю на снисхождение

ние читателя, подобно автору исторической хроники, подробнее повествующему о тех событиях, очевидцем и участником которых ему довелось оказаться.

В книге приведен список библиографических источников. Хотя он довольно обширен, но, конечно, далеко не исчерпывает всей литературы по мембранной биоэнергетике. Составляя этот список, я обычно включал в него первую публикацию по данному вопросу и последние обзоры либо экспериментальные статьи, где можно найти наиболее важные ссылки. Надеюсь, что такой принцип цитирования поможет читателю в поисках дальнейшей информации, если таковая ему потребуется.

Я очень благодарен А. А. Константинову и всем участникам теоретического семинара по биоэнергетике в лаборатории им. А. Н. Белозерского за ценные советы и критическое обсуждение многих вопросов, освещенных в этой книге. Я весьма признателен также О. О. Малаховской, А. Л. Драчеву, Т. Н. Константиновой, М. И. Мокеевой и С. А. Богословскому за помощь в подготовке рукописи к публикации.

Список сокращений

БАЛ	— британский антильонизит (2,3-димеркаптопропанол)	ADP	— аденозин-5'-дифосфат
БФео	— бактериофеофитин	AMP	— аденозин-5'-монофосфат
БХл	— бактериохлорофилл	ATP	— аденозин-5'-трифосфат
(БХл) ₂	— димер бактериохлорофилла	cAMP	— циклический аденозин-3',5'-монофосфат
(БХл) ₂ [*]	— возбужденный димер бактериохлорофилла	cGMP	— циклический гуанозин-3',5'-монофосфат
(БХл) ₂ ⁺	— катион-радикал димера бактериохлорофилла	CoA	— коэнзим А
ДБТХ	— дибромтимохинон	CoQ	— коэнзим Q, или убихинон
ДЦКД	— N,N'-дициклогексилкарбодимид	CoQ [•]	— анион-радикал коэнзима Q
ТМФД	— тетраметил- <i>n</i> -фенилендиамин	CoQH ₂	— восстановленный коэнзим Q, или дигидроубихинон
ТФБ ⁻	— тетрафенилборат	DCMU	— 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина
ТФФ ⁺	— тетрафенилфосфоний	FAD	— флавинаденин-динуклеотид
Фд	— ферредоксин	FADH ₂	— восстановленный флавинаденин-динуклеотид
Фео	— феофитин	FMN	— флавиномононуклеотид
ФМС	— феназинметосульфат	FMNH ₂	— восстановленный флавиномононуклеотид
ХКФ	— <i>m</i> -хлоркарбонилцианид-фенилгидразон	FeS	— негемовый железосерный кластер
Хл	— хлорофилл	GDP	— гуанозин-5'-дифосфат
Хл [*]	— возбужденный хлорофилл	GMP	— гуанозин-5'-монофосфат
Хл ⁺	— катион-радикал хлорофилла	GTP	— гуанозин-5'-трифосфат
ΔμH	— разность электрохимических потенциалов ионов водорода	HQNO	— 2-гептил-4-оксихинолин-N-оксид
ΔμI	— разность электрохимических потенциалов ионов I	MQ	— менахинон
ΔμK	— разность электрохимических потенциалов ионов калия	NAD ⁺	— окисленный никотинамидаденин-динуклеотид
ΔμNa	— разность электрохимических потенциалов ионов натрия	NADH	— восстановленный никотинамидаденин-динуклеотид
ΔΨ	— разность электрических потенциалов	NADP ⁺	— окисленный никотинамидаденин-динуклеотид-фосфат
Δp	— протондвижущая сила	NADPH	— восстановленный никотинамидаденин-динуклеотидфосфат
ΔpH	— разность концентраций ионов водорода	PQ	— пластохинон
ΔpK	— разность концентраций ионов калия	PQ [•]	— анион-радикал пластохинона
ΔpNa	— разность концентраций ионов натрия	PQH ₂	— пластогидрохинон
Δs	— натрийдвижущая сила	P _i	— неорганический фосфат
		PP _i	— неорганический пирофосфат

Введение в мембранную биоэнергетику

1.1. Биоэнергетика в системе биологических наук

Биологические науки можно классифицировать по трем основным критериям: уровню сложности изучаемого объекта, природе биологической функции, подлежащей исследованию, и методологии исследования.

На рис. 1 мы попытались изобразить «здание биологии», используя эти три критерия в качестве трех пространственных координат. Как видно из рис. 1, здание получается восьмиэтажным, если принять, что каждый уровень сложности занимает свой этаж. На самом верхнем этаже располагаются исследования биосферы. Сразу под ним — экология, изучающая сообщества различных видов живых существ. Следующий, шестой, этаж отведен группе биологических наук, изучающих отдельные виды животных, растений и бактерий и их систематику в целом. Среди этих наук — классическая зоология, ботаника, микробиология и вирусология. Всех их можно было бы объединить названием «биология видов», чтобы отличить от разделов биологии, размещенных на более высоких и более низких этажах.

Далее располагаются анатомия и физиология, науки, изучающие структуру и жизнедеятельность индивидуального организма и его органов. Следующий очень важный уровень — живая клетка. Соответствующая наука — клеточная биология, или цитология. Исследования на внутриклеточных органеллах и их фрагментах, гомогенатах, «тенях» клеток и других бесклеточных надмолекулярных системах могут быть объединены термином «субклеточная биология». Изучение функционирующих макромолекул и их комплексов составляет предмет молекулярной биологии. Это последний, самый простой уровень, где еще не утрачена биологическая функция. Структура и физико-химические характеристики веществ, составляющих живой организм, изучаются на первом этаже. В подавляющем большинстве случаев объектом исследования служат органические соединения. Поэтому соответствующая наука получила название биоорганической химии. Некоторые из веществ биологического происхождения относятся к неорганическим. Применительно к таким системам можно было бы говорить о бионеорганической химии, однако это направление вряд ли оправданно выделять в особую науку ввиду малочисленности объектов исследования.

Такова классификация «горизонтальных» наук, отличающихся по уровню организации изучаемой системы. Рассмотрим теперь «вертикальные» науки, взяв за основу функциональный принцип.

К наиболее важным функциям, присущим всем живым существам, можно отнести следующие:

1) самовоспроизведение: запись, хранение и использование генетической информации;

2) энергообеспечение: получение энергии за счет внешних энергетических ресурсов;

3) превращение веществ: использование химических соединений окружающей среды для образования компонентов своего тела;

4) раздражимость: способность принимать и обрабатывать сигналы, поступающие из внешней и внутренней сред организма, и адекватно отвечать на эти сигналы.

Каждую из этих функций можно изучать на объектах различной степени сложности.

Наука, изучающая функцию самовоспроизведения, — это всем известная генетика. Аналогичную науку, занятую другой функцией — энергообеспечением, можно определить как биоэнергетику. В этом смысле *биоэнергетика есть отрасль функциональной биологии, изучающая превращение энергии внешних ресурсов в биологически полезную работу*. В соответствии с этим определением можно различать молекулярную биоэнергетику, биоэнергетику клетки, целостного организма, биоценоза и биосферы.

Продолжая функциональную классификацию, мы должны определить науку, изучающую обеспечение живых систем веществами и превращения этих веществ. Названная область обычно рассматривается как часть биохимии, или, в более узком смысле, энзимологии. Если, однако, принять во внимание огромное значение функциональной биологии, которая, по существу, интегрирует знания, полученные «горизонтальными» биологическими науками, то окажется оправданным присвоение ранга самостоятельной науки каждому из четырех направлений, связанных с исследованием перечисленных выше важнейших биологических функций. По аналогии с генетикой и биоэнергетикой наука, исследующая метаболизм как превращение веществ, могла бы называться метаболикой. Соответственно будущая наука, призванная объединить биохимические, физиологические и прочие исследования по восприятию, передаче и обработке сигналов различных сенсорных систем, могла бы получить имя «сенсорика».

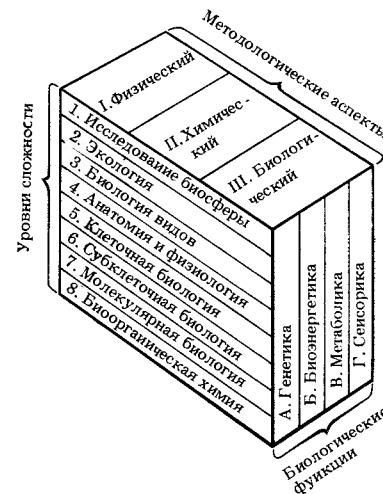


Рис. 1. «Здание биологии» — схема, иллюстрирующая соотношения различных биологических наук

Еще один способ классификации основывается на методологии исследования. Здесь можно выделить три главных направления: физическое, химическое и биологическое. В первом случае соответствующая наука определяется как биофизика, во втором — как биохимия. Что касается собственно биологической методологии, то ее можно иллюстрировать такими подходами, как эволюционный, фило- и онтогенетический, учением об естественном отборе и т. п.

«Здание биологии», показанное на рис. 1, при необходимости может быть достроено: например, увеличение веса математического подхода может в будущем привести к необходимости выделить не три, а четыре методологических раздела.

Схема, изображенная на рис. 1, рассматривает лишь фундаментальные аспекты биологии. Для прикладной биологии, или биотехнологии, необходимо сконструировать отдельное здание.

Любое биологическое исследование фундаментального плана может найти свое место в схеме на рис. 1. В частности, предметом данной книги служит рассмотрение проблем, расположенных в «помещениях» Б, I—III, 5—8. Эти координаты означают физический, химический и биологический аспекты биоэнергетики на уровнях организации от клетки до органических и неорганических молекул биологического происхождения.

В своем изложении мы попытаемся сконцентрировать внимание на мембранных биоэнергетических системах, поскольку именно они занимают центральное положение в процессах получения конвертируемой энергии, утилизируемой живой клеткой. Биологическому аспекту этих проблем будет отдано предпочтение в силу того, что автор этой книги — биолог.

1.2. Определение основных понятий

1.2.1. Мембраны с точки зрения биоэнергетика

Биологические мембраны представляют собой природные пленки толщиной 5—7 мкм, состоящие из белков и липидов.

Липидный компонент биомембран более или менее стандартен: это фосфолипиды или (реже) глико- и сульфоллипиды.

Белок — вот тот компонент, который, как правило, определяет специфику, так сказать, «лицо» мембраны. Среди мембранных белков можно найти многие ферменты, переносчики, пигменты и рецепторы. Взаимодействие процессов, осуществляемых всеми этими биологически активными компонентами, лежит в основе функционирования мембранных структур клетки.

Важнейшей функцией многих биомембран служит превращение одной формы энергии в другую. Эта функция осуществляется

специальными белками, встроенными в особую мембрану, носящую название *энергопреобразующей*. Такая мембрана непроницаема для подавляющего большинства веществ, которые имеются в растворах по обе ее стороны.

Любая мембрана, выполняющая энергетическую функцию, способна к превращению *химической энергии* окисляемых субстратов или АТФ либо *энергии света* в *электрическую энергию*, а именно в трансмембранную разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) или в *энергию разности концентраций* веществ, содержащихся в разделенных мембраной растворах. Энергию, заключенную в разности концентраций растворенных веществ, часто называют осмотической энергией.

Некоторые энергопреобразующие мембраны могут превращать электрическую или осмотическую энергию в механическую, как это имеет место у подвижных прокариот. Определенные ткани теплокровных животных, а также некоторые растения превращают накопленную энергию в тепло в целях терморегуляции, что оказывается биологически оправданным при понижении окружающей температуры.

Среди энергопреобразующих мембран, имеющих наибольшее биологическое значение, можно назвать такие структуры, как внутреннюю мембрану митохондрий, внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану бактерий, внешнюю мембрану клеток эукариот, мембрану бактериальных хроматофоров, тилакоидов хлоропластов и цианобактерий, вакуолярную мембрану (тонопласт) растений и грибов.

Не все биомембраны могут превращать одну форму энергии в другую. Некоторые из них не несут энергетических функций. Таковы, в частности, внешние мембраны митохондрий и грамотрицательных бактерий. В обеих названных мембранах содержится особый белок — порин, образующий в них довольно большие поры, проницаемые для низкомолекулярных соединений [396, 944, 1111]. Внешние мембраны митохондрий и бактерий служат барьером, непроницаемым для белков, растворенных в пространстве между внешней и внутренней мембраной. Кроме того, внешние мембраны содержат некоторые якорные белки, специфически связывающие наподобие рецепторов определенные компоненты цитозоля (в случае митохондрий) или внешней среды (в случае бактерий). Некоторые из рецепторподобных белков были идентифицированы с поринами.

В животных клетках порин был обнаружен только во внешней мембране митохондрий [944]. Тем не менее минимум еще одна мембрана в этих клетках напоминает внешнюю митохондриальную, будучи проницаемой (по крайней мере *in vitro*) для небольших гидрофильных молекул. Это мембрана пероксисом. Возможно, однако, что данное свойство есть артефакт выделения названных органелл.



Рис. 2. Мембранные структуры животной клетки

Темными сплошными контурами показаны мембраны, преобразующие энергию, темными прерывистыми — свободные от энергетических функций. Светлыми контурами очерчены мембраны, участие которых в превращениях энергии остается недостаточно ясным

Внешняя мембрана оболочки хлоропласта, по-видимому, гомологична внешней мембране митохондрий и бактерий [826].

Традиционно мембраны эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, а также мембраны клеточного ядра считаются неспособными к трансформации энергии. Однако недавно были получены указания на то, что в аппарате Гольджи энергия АТФ может использоваться для создания градиента рН между цитозолем и внутренним объемом этих замкнутых мембранных структур [221, 1644]. Такое наблюдение заставляет вернуться к вопросу о возможной энергопреобразующей функции мембран эндоплазматической сети и ядра, родственных мембранам аппарата Гольджи.

Современное состояние проблемы биоэнергетической классификации мембран животной клетки представлено на рис. 2.

1.2.2. Сопрягающие ионы

В огромном большинстве случаев преобразование энергии в биомембранах описывается следующей общей схемой:

энергетические ресурсы $\rightarrow \Delta\mu I \rightarrow$ работа, (1)
где $\Delta\mu I$ есть трансмембранная разность электрохимических потенциалов иона I. (Физическая природа $\Delta\mu I$ будет рассмотрена ниже применительно к $\Delta\mu H$ в разделе 1.3.) Уравнение (1) означает, что энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, сначала используются для транспорта иона I через мембрану против сил электрического поля и в направлении большей концентрации I. Этот процесс называют *энергизацией мембраны*. Затем энергия, накопленная в электрической и осмотической форме, используется в качестве движущей силы, чтобы совершать ту или иную полезную работу.

Таким образом, процессы утилизации внешней энергии и совершения за ее счет работы оказываются сопряжены через образование и использование $\Delta\mu I$. Поэтому ион I может быть назван *сопрягающим ионом*.

До недавнего времени общепринятая точка зрения состояла в том, что в энергопреобразующих мембранах роль сопрягающего иона играет H^+ , как то было постулировано в 1961 г. Питером Митчелом [1043]. Единственным исключением считалась внешняя мембрана животной клетки, использующая не H^+ , а Na^+ в качестве иона, сопрягающего гидролиз АТФ с аккумуляцией различных метаболитов внутри клетки.

Однако недавние исследования показали, что Na^+ заменяет H^+ в процессах энергизации мембраны определенных бактерий, а $\Delta\mu Na$ может использоваться для осуществления всех тех типов полезной работы, для которых требуется мембрана. Следовательно, H^+ не уникален в качестве сопрягающего иона (см. гл. 7).

Есть еще несколько ионов, помимо H^+ и Na^+ , которые также могут транспортироваться через мембрану против силы их электрохимического градиента. Например, в эндоплазматическом ретикулуме мышц и ряде других тканей, а также во внешней мембране многих клеток есть Ca^{2+} -АТФазы, переносящая ионы Ca^{2+} с использованием энергии АТФ. Однако роль этого процесса ограничивается понижением концентрации Ca^{2+} в цитозоле, а образующаяся $\Delta\mu Ca$ никогда не используется для совершения какой-либо работы. Это же справедливо и для ионов K^+ , транспортируемых Na^+/K^+ - или H^+/K^+ -АТФазой (см. соответственно разделы 4.5.3 и 7.1.3.2), а также для ионов Cl^- , переносимых галородопсином (см. раздел 3.5.8.1).

Ниже приведена биоэнергетическая классификация мембран.

А. Энергопреобразующие мембраны, использующие H^+ как сопрягающий ион:

- 1) внутренняя мембрана митохондрии;
- 2) мембрана тилакоидов хлоропластов;
- 3) внутренняя мембрана оболочки хлоропласта;
- 4) внутренняя (цитоплазматическая) мембрана многих бактерий;
- 5) мембрана бактериальных хромофоров;
- 6) внешняя мембрана клеток растений и грибов;
- 7) мембрана вакуолей (тонопласт) растений и грибов;
- 8) мембрана хромоаффинных и некоторых других секреторных гранул животной клетки.

Б. Энергопреобразующие мембраны, использующие Na^+ как сопрягающий ион:

- 1) внешняя мембрана животной клетки;
- 2) внутренняя (цитоплазматическая) мембрана некоторых морских щелочустойчивых аэробных бактерий и морских анаэробных бактерий.

В. Энергопреобразующие мембраны, роль которых ограничивается созданием ионного градиента:

- 1) мембраны лизосом и, вероятно, также аппарата Гольджи (превращение энергии по типу $ATP \rightarrow \Delta\bar{\mu}H$);
- 2) внешняя мембрана некоторых животных клеток, например клеток слизистой желудка ($ATP \rightarrow \Delta\bar{\mu}H$);
- 3) саркоплазматический ретикулум и другие пузырьки, накапливающие Ca^{2+} ($ATP \rightarrow \Delta\bar{\mu}Ca$).

Г. Мембраны, не способные к превращению энергии:

- 1) внешняя мембрана митохондрии;
- 2) внешняя мембрана оболочки хлоропласта;
- 3) внешняя мембрана бактерий;
- 4) мембрана пероксисом.

Д. Мембраны, энергетические функции которых не доказаны, но и не исключены:

- 1) эндоплазматический ретикулум (микросомы);
- 2) мембрана клеточного ядра.

В группах А и Б перечислены сопрягающие мембраны. Все эти структуры специализированы на сопряжении освобождающих и потребляющих энергию процессов посредством образования и использования $\Delta\bar{\mu}H$ (группа А) или $\Delta\bar{\mu}Na$ (группа Б). В группе В объединены мембраны, для которых образование $\Delta\bar{\mu}I$ представляется конечным событием процесса преобразования энергии. Это имеет место в тех случаях, когда функция мембраны состоит в перекачке иона из одного отсека в другой. В группе Г указаны мембраны, для которых можно с уверенностью исключить какие-либо энергетические функции. Случай, когда вопрос о возможных энергетических функциях остается открытым, перечислены в группе Д.

1.2.3. Конвертируемые энергетические «валюты» живой клетки

Энергетические превращения, протекающие в живой клетке, могут быть подразделены на две группы: одни из них локализованы в мембранах, а другие — в немембранных отделах протоплазмы. В каждой из групп используется своя «валюта» для оплаты энергетических затрат. В мембранах это $\Delta\bar{\mu}H$ или $\Delta\bar{\mu}Na$, в немембранных отделах — АТФ или другие высокоэнергетические вещества.

Энергия $\Delta\bar{\mu}H$ и $\Delta\bar{\mu}Na$ может обратимо превращаться в энергию АТФ. Процессы такого рода катализируются H^+ —АТФ-синтазой (H^+ —АТФазой) в «протонных» мембранах, несущих $\Delta\bar{\mu}H$, и Na^+ —АТФ-синтазой (Na^+ —АТФазой) или Na^+/K^+ —АТФазой в «натриевых» мембранах, поддерживающих $\Delta\bar{\mu}Na$.

На рис. 3 приведена схема, описывающая энергетику живых клеток, использующих $\Delta\bar{\mu}H$ в качестве мембранной формы кон-

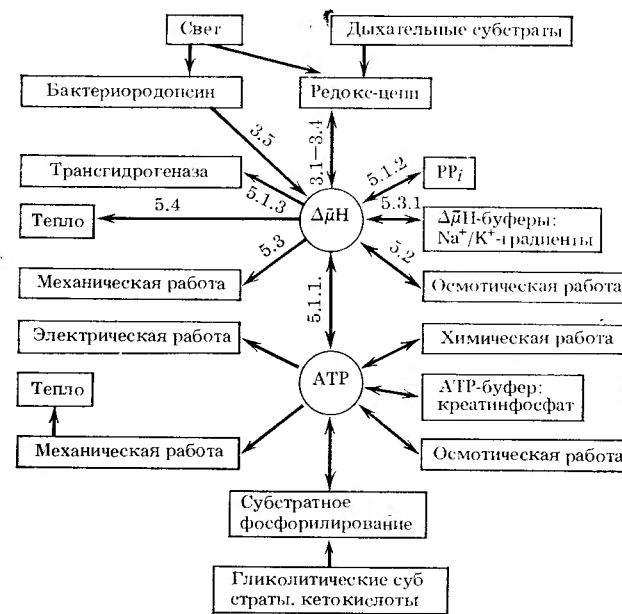


Рис. 3. Общая схема энергетики клетки, использующей $\Delta\bar{\mu}H$ в качестве мембранной конвертируемой формы энергии [129, 1407]

Цифры у стрелок обозначают разделы книги, где рассматривается данный $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимый процесс

вертируемой энергии. Согласно схеме, свет или энергия субстратов дыхания может утилизироваться ферментами фотосинтетической или дыхательной редокс-цепей либо (у галобактерий) бактериородопсином. В результате образуется $\Delta\bar{\mu}H$, которая затем используется для совершения работы, в частности, для синтеза АТФ. Субстратные фосфорилирования служат альтернативным механизмом образования АТФ, который не требует $\Delta\bar{\mu}H$. Такие фосфорилирования происходят в цепи реакций гликолиза и при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты [1407, 125].

$\Delta\bar{\mu}H$ -зависимое образование АТФ — главный, но не единственный процесс трансформации $\Delta\bar{\mu}H$ в химическую работу. К тому же типу энергетических превращений относятся синтез неорганического пиррофосфата и перенос восстановительных эквивалентов в направлении более отрицательных редокс-потенциалов. Таковы обратный перенос электронов в дыхательной цепи и трансгидрогеназная реакция.

Зависящий от $\Delta\bar{\mu}H$ транспорт через мембрану различных веществ в сторону большей их концентрации представляет собой

трансформацию энергии по типу $\Delta\bar{\mu}H \rightarrow$ осмотическая работа, а вращение бактериального жгутика за счет энергии $\Delta\bar{\mu}H$ служит примером превращения $\Delta\bar{\mu}H$ в механическую работу. Образование тепла митохондриями животных в ответ на понижение окружающей температуры описывается превращением $\Delta\bar{\mu}H \rightarrow$ теплопродукция.

В немембранных частях клетки также описаны все перечисленные выше типы энергетических превращений. Здесь они поддерживаются энергией АТР и других высокоэнергетических соединений.

Существуют системы, специализированные на стабилизации (забуферивании) уровней $\Delta\bar{\mu}H$ и АТР. Для $\Delta\bar{\mu}H$ эту роль играют градиенты ионов Na^+ и K^+ , для АТР — креатинфосфат.

У целого ряда бактерий вместо $\Delta\bar{\mu}H$ образуется $\Delta\bar{\mu}Na$. Источниками энергии могут служить дыхание или неокислительное декарбоксилирование карбоновых кислот. Образованная $\Delta\bar{\mu}Na$ используется для производства химической, осмотической и механической работы (см. гл. 7).

Наиболее сложный характер носит энергетика животной клетки. Фактически здесь в ходу три различные энергетические «валюты»: $\Delta\bar{\mu}H$ в митохондриях, $\Delta\bar{\mu}Na$ на внешней клеточной мембране и АТР в прочих частях клетки.

1.3. $\Delta\bar{\mu}H$, Δp , $\Delta\bar{\mu}Na$ и Δs

Как показано на рис. 3, трансмембранная разность электрохимических потенциалов ($\Delta\bar{\mu}H$, или протонный потенциал) занимает центральное положение в системе процессов трансформации энергии, происходящих в «протонных» мембранах. $\Delta\bar{\mu}H$ состоит из двух компонентов: 1) электрического и 2) химического (иначе концентрационного, или осмотического). Первый из них — трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$), второй — трансмембранная разность концентраций ионов водорода (ΔpH).

Рис. 4 иллюстрирует эти два понятия. Если между двумя отсеками, разделенными мембраной, существует разность электрических потенциалов, образованная, скажем, электрической батареей, то оказывается энергетически выгодным перемещение ионов H^+ из отсека, заряженного положительно, в отрицательно заряженный отсек (на рис. 4, а движение H^+ слева направо). Другой способ достичь той же цели — закислить левый отсек относительно правого. В этом случае протонный ток слева направо также будет идти «под гору» (см. рис. 4, б).

Потенциальная энергия, накопленная в виде $\Delta\psi$ или ΔpH , может быть утилизирована полезным образом, если поместить в мембрану устройство, сопрягающее перенос протонов «под гору» с совершением какой-либо полезной работы.

Энергия, накопленная в форме $\Delta\bar{\mu}H$, может быть рассчитана по уравнению (2):

$$\Delta\bar{\mu}H = -F\Delta\psi + RT \ln ([H^+]_n/[H^+]_o), \quad (2)$$

где $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — число Фарадея, $[H^+]_n$ и $[H^+]_o$ — молярные концентрации ионов H^+ в соответственно положительно заряженном (или более кислом) и в отрицательно заряженном (или более щелочном) отсеках.

$\Delta\bar{\mu}H$ измеряется в джоулях на моль⁻¹ [958]. Для перевода $\Delta\bar{\mu}H$ в вольты эту величину необходимо разделить на число Фарадея. Полученное частное Митчел [1045] предложил называть протондвижущей силой по аналогии с электродвижущей силой и обозначил ее символом Δp . Для 25° Δp может быть рассчитана по уравнению (3):

$$\Delta p = \Delta\bar{\mu}H/F = \Delta\psi - 0,06 \Delta pH. \quad (3)$$

Знак вычитания между $\Delta\psi$ и ΔpH обусловлен тем, что pH есть отрицательный логарифм концентрации водородных ионов. Применительно к рис. 4 это обстоятельство иллюстрируется фактом, что $\Delta\bar{\mu}H$ будет тем больше, чем выше положительный заряд и чем ниже pH в левом отсеке.

Согласно уравнению (3), ΔpH , равная 1, эквивалентна $\Delta\psi$, равной 0,06 В, или 60 мВ. Та же величина, выраженная в килоджоулях на моль⁻¹, будет равна 5,7, а в килокалориях на моль⁻¹ — 1,37.

Аналогичные уравнения можно применить также и к натриевой энергетике. В этом случае в уравнении (3) вместо $\Delta\bar{\mu}H$ надо подставить $\Delta\bar{\mu}Na$, а вместо Δp — натрийдвижущую силу, которую можно обозначить Δs (s от sodium):

$$\Delta s = \Delta\bar{\mu}Na/F = \Delta\psi - 0,06 \Delta pNa. \quad (4)$$

1.4. Аденозинтрифосфат

Концепция, рассматривающая АТР в качестве конвертируемой энергетической «валюты», была выдвинута Липманом еще в 1941 г. [949], т. е. задолго до того, как стала понятной аналогичная роль $\Delta\bar{\mu}H$.

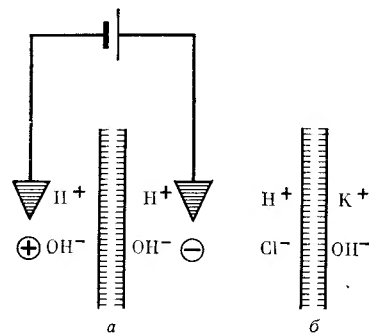


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая наличие $\Delta\psi$ (а) и ΔpH (б) между двумя отсеками, разделенными мембраной

АТР (рис. 5) образуется из АДР и неорганического фосфата системами фотосинтетического, дыхательного и субстратного фосфорилирования. Некоторое количество АТР расходуется мембранными АТРазами для совершения осмотической или электрической работы при транспорте ионов «в гору», т. е. в сторону большей их

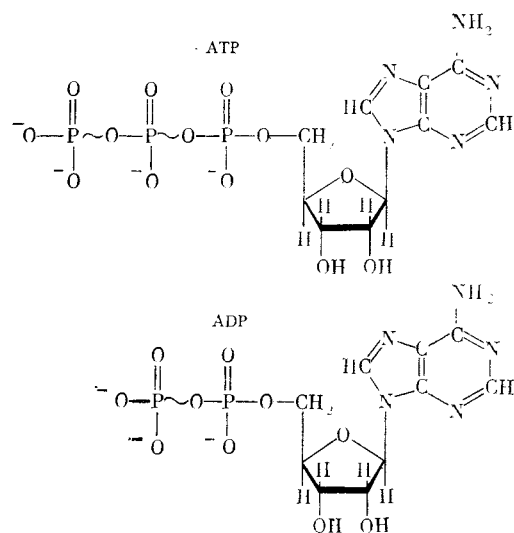


Рис. 5. Аденозинтри- и аденозиндифосфат

концентрации. Остальное используется в качестве источника энергии при многочисленных эндэргонических процессах, протекающих вне мембран. Таковы прежде всего АТР-зависимые биосинтезы и связанные с ними реакции, сократительные АТРазные системы и т. д.

В некоторых случаях используется не АТР, а какой-либо из других нуклеозидтрифосфатов. Так, например, работа рибосом обеспечивается энергией GTP [138]. Однако GTP обычно образуется из GDP за счет переноса концевой фосфатной группы с АТР. Процесс катализируется нуклеозиддифосфаткиназой:



Следовательно, и в этом случае также эндэргоническая реакция связана с энергодающим процессом через АТР.

АТР и все вещества, могущие образовать АТР в ферментативных реакциях переноса групп, объединяются термином *высокоэнергетические соединения*. Изменение свободной энергии при гидролизе аких соединений всегда не меньше, чем таковое у АТР, т. е.

10 ккал·моль⁻¹ при физиологических условиях (при стандартных условиях эта величина для АТР составляет около 7 ккал·моль⁻¹).

Следует подчеркнуть, что термин «высокоэнергетические соединения» имеет скорее биологический, чем химический смысл. Эту мысль можно пояснить следующим примером. Креатинфосфат служит высокоэнергетическим соединением у позвоночных, располагающих ферментом креатинфосфокиназой, который катализирует обратимый перенос фосфила между АТР и креатином. В то же время у некоторых беспозвоночных, где роль буфера для АТР играет аргининфосфат, а креатинфосфокиназа отсутствует, креатинфосфат уже не является высокоэнергетическим соединением, если следовать определению, данному выше.

В то же время было бы ошибочным считать высокоэнергетические соединения какой-то особой биологической формой энергии. Все они в общем-то обычные вещества. Точно также нет ничего мистического в величине их энергии гидролиза порядка 10 ккал·моль⁻¹. В химическом смысле низкоэнергетические биорганические соединения не отделены от высокоэнергетических иным барьером, кроме возможности находиться в равновесии с АТР. По энергиям гидролиза вещества образуют непрерывный ряд. Если эта энергия заметно меньше 10 ккал·моль⁻¹, как, например, у 2-фосфоглицериновой кислоты, АТР не может быть образован в реакции переноса фосфатной группы. Чтобы стать предшественником АТР, 2-фосфоглицериновая кислота должна быть окислена до фосфоенолпировиноградной кислоты.

При использовании энергии АТР этот нуклеотид сначала сорбируется на соответствующем ферменте и затем гидролизуется. Иногда энергия выделяется при сорбции АТР, а не при гидролизе, при этом сорбированный («распятый» на ферменте) АТР оказывается низкоэнергетическим соединением (см. ниже раздел 5.1.1.4). В подобных случаях сродство АТР к ферменту оказывается много большим, чем сродство АДР и фосфата, и роль гидролиза связанного АТР ограничивается удалением продуктов реакции из активного центра фермента.

Существуют два пути гидролиза АТР:



Гидролиз терминального фосфата в АТР происходит в тех случаях, когда эндэргонический процесс, движимый гидролизом АТР, требует энергии *меньшей* или *равной* 10 ккал·моль⁻¹.

Так же происходит обеспечение процессов, требующих *более* 10 ккал·моль⁻¹. В таких случаях имеется особый механизм, позволяющий использовать энергию многих молекул АТР для совершения одного функционального акта (примером тому может быть актомиозин).

Когда же потребность в энергии лишь *немного больше* 10 ккал·моль⁻¹, АТР гидролизуетсЯ до АМР и неорганического пирофосфата.

В стандартных условиях обе ангидридные связи в молекуле АТР имеют близкие энергии гидролиза. Однако в реальных условиях клетки выход энергии при гидролизе АТР до АМР и РР_i на несколько килокалорий превосходит таковой при его гидролизе до АДФ и Р_i.

Данный эффект обусловлен намного более низкой концентрацией неорганического пирофосфата по сравнению с неорганическим фосфатом вследствие гидролиза образующегося РР_i растворимой пирофосфатазой.

Таким образом, использование в качестве конвертируемой «валюты» аденозинтрифосфата, а не аденозиндифосфата сообщает дополнительную гибкость биологической системе энергообеспечения.

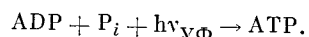
Следующий вопрос: почему для этой функции было выбрано соединение, относящееся к разделу *нуклеотидов*? По-видимому, названное обстоятельство есть следствие более общего принципа, утверждающего, что жизнь базируется на специфических взаимодействиях белков с моно- и полинуклеотидами.

Сходный вопрос — почему используется аденозинтрифосфат, т. е. почему именно фосфорил служит высокоэнергетической группировкой. В этой связи можно лишь отметить, что замена атома Р на близкий по свойствам атом As дает АДФ-арсенат, аналог АТР, который оказывается весьма неустойчивым и спонтанно гидролизуетсЯ при физиологических условиях.

Почему среди нуклеозидтрифосфатов эволюция выбрала именно аденозинтрифосфат? Одной из причин могло быть то, что аденин в ряду других азотистых оснований обладает промежуточными электронодонорными и акцепторными свойствами. Другие азотистые основания либо сильные доноры, либо сильные акцепторы [125]. Быть может именно поэтому АТР способен взаимодействовать с более широким кругом партнеров, чем другие нуклеозидтрифосфаты.

Другая причина могла быть эволюционного плана. Среди азотистых оснований аденин наиболее стабилен к разрушительному действию ультрафиолетового света. Не исключено, что это свойство было существенным на заре становления земной жизни, если в те времена атмосфера Земли была проницаема для ультрафиолета или если жизнь возникла за пределами Земли в какой-то области космоса, богатой ультрафиолетом¹.

¹ Интригующая возможность состоит в том, что АДФ служил первичным преобразователем энергии у первых живых организмов, участвуя в следующем процессе [113, 125]:



1.5. Липидный компонент биомембран

Наиболее типичным представителем мембранных липидов служит фосфолипид. Подавляющее большинство фосфолипидов принадлежит классу фосфатидов. Они содержат два остатка жирных кислот, $\text{C}_n\text{H}_m\text{CO}-$ (у некоторых бактерий жирных алкилов, C_nH_m-), глицерин и фосфат. Обычно при фосфатном остатке имеется какой-либо гидрофильный заместитель (рис. 6, а).

Число углеродных атомов в жирных ацилах (n) варьирует, как правило, от 12 до 20, причем чаще оно равно 16 или 18 (табл. 1).

Таблица 1. Типичные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов

Название кислоты	Число атомов С; число двойных связей	Структура
Насыщенные		
Лауриновая	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Миристиновая	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Пальмитиновая	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Стеариновая	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Арахидиновая	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Ненасыщенные		
Пальмитолеиновая	16 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Олеиновая	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линолевая	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линоленовая	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Арахидоновая	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \cdot \text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH} \cdot (\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Кванты среднего ультрафиолета, поглощаемые аденином, несут наибольший запас энергии, который еще необратимо не разрушает поглощающие их вещества. Возбуждение могло бы повысить реактивность какой-либо из функциональных групп аденина (например, аминогруппы) к Р_i и тем самым индуцировать ее фосфорилирование. Перенос фосфора с аминогруппы АДФ на концевой фосфат этой же молекулы может облегчаться тем обстоятельством, что в одной из возможных конформаций АДФ между аминогруппой аденина и терминальным фосфатом остается место, по размеру в точности равное еще одному фосфатному остатку [120]. В пользу изложенной гипотезы можно привести экспериментальное наблюдение по ферментативному синтезу АТР из АДФ и Р_i под действием ультрафиолетового облучения [113, 1196].

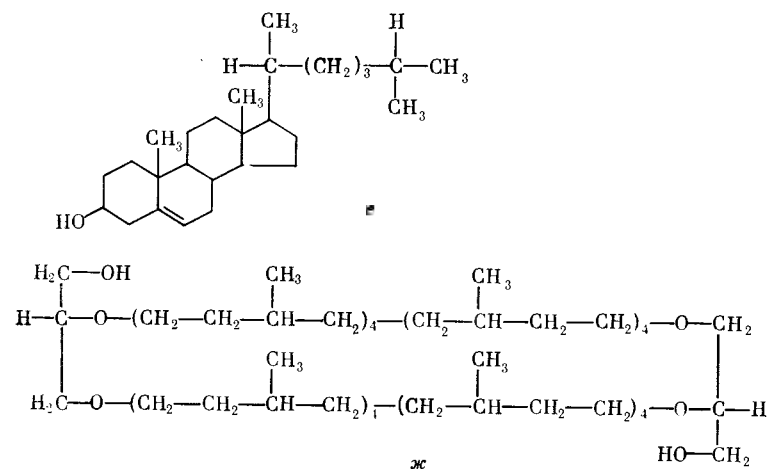
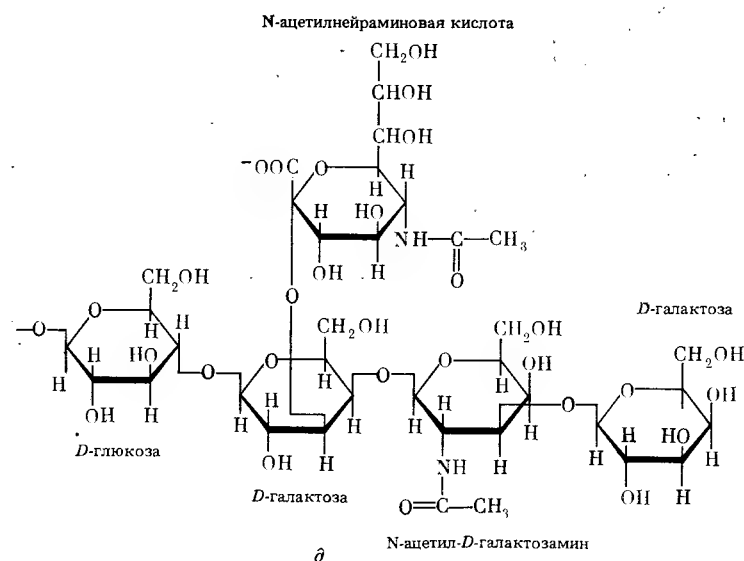
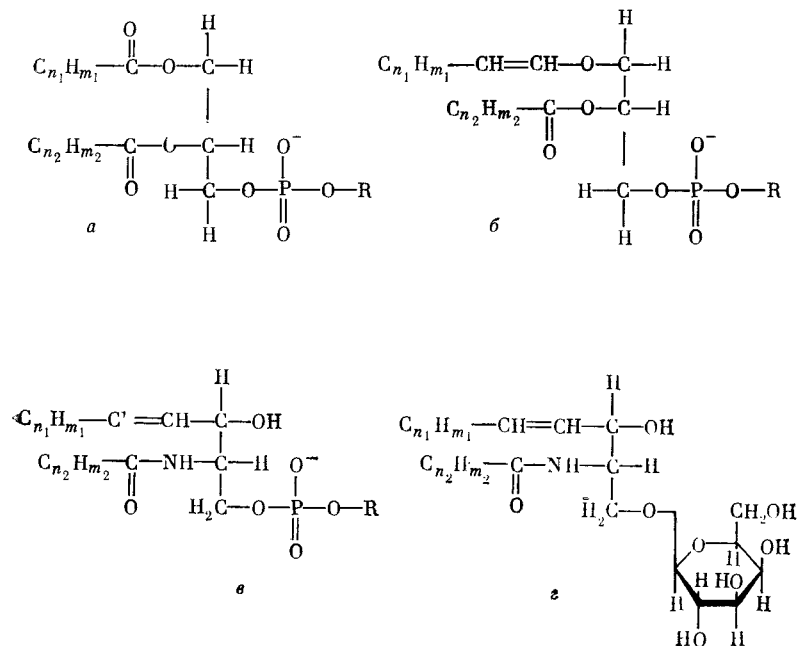


Рис. 6. Структуры некоторых липидов биологических мембран

а — общая структура большинства фосфолипидов, б — плазмалоген, в — сфингомиелин, г — цереброзид, д — олигосахаридный остаток одного из ганглиозидов, е — холестерин, ж — один из липидов из мембраны *Caldariella acidophila*

В типичном случае фосфолипид содержит по одному остатку насыщенной и ненасыщенной жирной кислоты, которые располагаются соответственно при первом и втором углеродном атоме глицерина. Однако бывают и исключения из этого правила. Так, у термофильных бактерий оба гидрофобных остатка представлены насыщенными разветвленными алкилами.

В табл. 2 приведены структуры гидрофильных остатков (R) при фосфате фосфолипидов. У одного из фосфатидов, а именно фосфатидной кислоты, остаток R отсутствует.

У животных фосфолипид кардиолипин обнаружен только во внутренней мембране митохондрий. Замененные фосфатидилглицерины присущи внутренней бактериальной мембране.

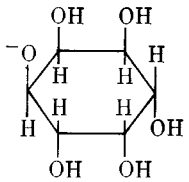
В фосфатидилинозите спиртовые гидроксилы могут быть фосфорилированы. В частности, фосфатидилинозит-5,6-дифосфат играет важную роль в передаче гормональных сигналов (см. раздел 7.5).

В фосфолипидах, называемых плазмалогенами, жирный ацил при С-1 глицерина замещен на производное α, β -ненасыщенного спирта (см. рис. 6, б).

Родственные соединения принадлежат к группе сфинголипидов, найденных у животных и растений. Наиболее распространены сфингомиелин (см. рис. 6, в) и цереброзид (см. рис. 6, г).

Отметим, что цереброзид не содержит фосфата, который заменен на галактозу. Иногда на месте галактозы может быть глюкоза или олигосахарид. В последнем случае гликолипид носит

Таблица 2. Заместители при фосфатной группе фосфолипидов

Фосфолипид	Заместитель
Фосфатидилхолин	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Фосфатидилэтаноламин	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Фосфатидилсерин	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Фосфатидилинозит	
Фосфатидилглицерин	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
Кардиолипин	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{O}-\text{C}-\text{C}_{n_1}\text{H}_{m_1})-\text{C}(\text{H})(\text{O}-\text{C}-\text{C}_{n_2}\text{H}_{m_2}))_2$

название ганглиозида. Пример олигосахарида, входящего в состав ганглиозида, приведен на рис. 6, д.

Среди нейтральных липидов биомембран следует упомянуть стероиды. В большинстве мембран животных клеток содержится довольно много холестерина (см. рис. 6, е).

Исключение составляет внутренняя мембрана митохондрий, где уровень холестерина очень низок. Его нет в мембранах бактерий. (Холестерин, найденный в мембране паразитической микоплазмы, принадлежит клетке хозяина.) У растений и грибов холестерин заменен его аналогами (соответственно фито- и микостеринами).

1.6. Липидный бислой

Хорошо известно, что фосфолипиды способны к спонтанному образованию бислойных мембран. Такую мембрану можно получить, поместив каплю раствора фосфолипидов в декане на маленькое отверстие в тефлоновой перегородке, разделяющей два отсека с водными растворами. Толщина мембраны соответствует удвоенной длине углеводородных остатков фосфолипидов, что

меньше длины волны видимого света. Не преломляя свет, бислойная мембрана невидима, и потому ее часто называют черной. Если каждый из углеводородных остатков содержит по 16 углеродных атомов, то толщина гидрофобного слоя мембраны оказывается около 4 нм. Это значит, что мембранные фосфолипиды ориентированы по принципу «хвост к хвосту». Такая структура обладает минимумом энергии и для ее образования не требуется ничего, кроме фосфолипидов.

В бислое минимальная площадь, занятая, например, фосфатидилхолином, равна 0,75 нм².

Молекулы фосфолипидов легко перемещаются в плоскости мембраны, двигаясь в пределах монослоя. В то же время скорость перехода фосфолипида из одного монослоя в другой крайне мала. Описан прецедент, когда этот процесс вообще невозможен, так как два образующих мембрану монослоя ковалентно связаны. Было показано [446, 447], что мембрана термоацидофильной архебактерии *Caldariella acidophila*, живущей при кислых pH и температуре вплоть до 90°, содержит в качестве липидного компонента тетраэфиры 16,16'-бифитонилглицерина. Простейший из таких биполярных липидов включает в свой состав две гидрофильные группы (остатки глицерина) по краям, а между ними — два разветвленных углеводородных скелета, каждый из которых может пересечь всю гидрофобную область обычной бислойной мембраны (см. рис. 6, ж).

Другой представитель липидов *C. acidophila* вместо остатков глицерина содержит глицериннонитные группы. Такой липид образует стабильные фосфолипидные мембраны при температуре не ниже 70° [615].

1.7. Мембранные белки

Белки могут быть интегрированы с мембраной двумя различными способами: сорбцией на поверхности мембраны или погружением в ее гидрофобный слой.

Первый тип взаимодействия более лабилен и поэтому часто ускользает от внимания мембранологов. Неудивительно, что список белков, способных образовывать лабильные связи с мембранами, становится все обширнее по мере увеличения числа исследований на эту тему. Сегодня в этом списке уже можно найти гексокиназу [559, 945, 1089] и дитрат-синтазу [417], т. е. ключевые ферменты гликолиза и цикла Кребса — процессов, происходящих, как было принято считать, в водной фазе клетки. В случае гексокиназы показано, что специфическое связывание этого фермента осуществляется порином, локализованным во внешней митохондриальной мембране.

Белок-белковые взаимодействия ответственны также за связывание каталитической части $\text{H}^+ - \text{АТФ-синтазы}$ (фактора F_1)

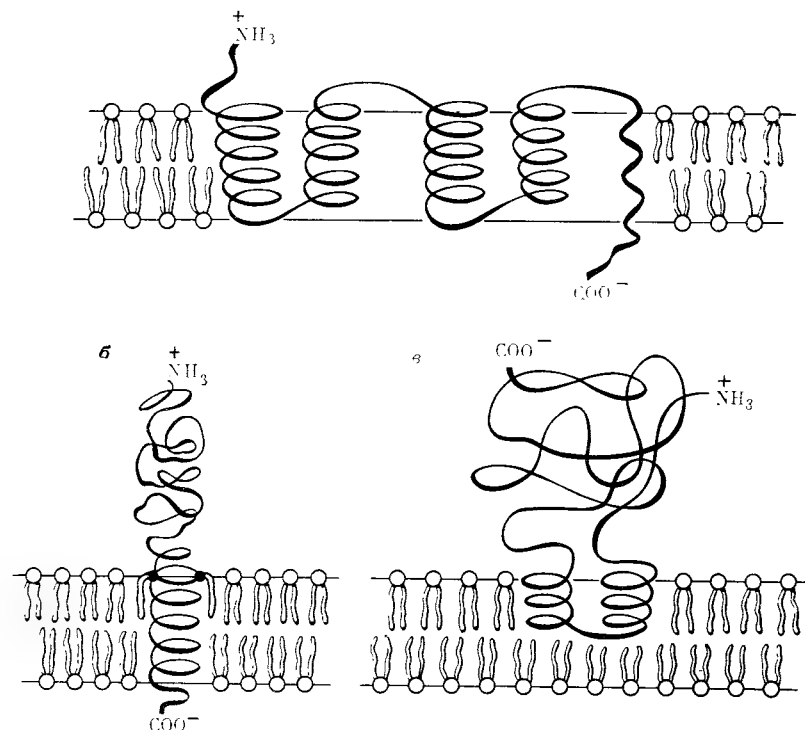


Рис. 7. Различные типы организации мембранных белков

а — белок почти полностью погружен в мембрану. Полипептидная цепь пересекает мембрану несколько раз, образуя α -спиральные колонны. Таким образом устроен бактериородопсин;

б — сравнительно небольшая гидрофобная часть белка погружена в мембрану, пересекая всю ее толщину. Большая (гидрофильная) часть белка экспонирована в воду. Для стабилизации связи с мембраной иногда имеет место ковалентное присоединение жирных кислот к белку. Места прикрепления жирных кислот показаны черными кружками (из работы Шлессинджера и Маги [1318]);

в — гидрофобный «якорь» белка проникает только на расстояние фосфолипидного монослоя. По мнению Стриттматтера, именно так крепится к мембране цитохром b_5 (из Стриттматтера и Дэйли [1464]; см., однако, работу Гоголя и Энгельмана [623], где предполагается, что «якорь» цитохрома b_5 пересекает всю мембрану)

мембранным сектором того же фермента (фактором F_0) (см. ниже раздел 5.1.1.2). Цитохром c , который, подобно гексокиназе или фактору F_1 , хорошо растворим в воде, образует солевые связи с нерастворимым в воде мембранным белком — цитохромоксидазой. Цитохром c — щелочной белок, а тот участок цитохромоксидазы, который с ним взаимодействует, несет несколько кислотных групп. Кислотно-основное взаимодействие двух белков-партнеров может быть нарушено повышением ионной силы раствора, которое приводит к экстракции цитохрома c из мембраны.

Описан пример того, как фосфолипид, а не белок, служит специфическим мембранным партнером, ответственным за лабильное связывание фермента с поверхностью мембраны. Было выяснено, что креатинфосфокиназа может связываться с внутренней (но не с внешней) митохондриальной мембраной. Причиной этого оказалось присутствие во внутренней мембране кардиолипина. Взаимодействие фермента с митохондриями блокировал адриамидин, связывающий кардиолипин. Креатинкиназу удалось сорбировать на липосомах при условии, что в состав их мембраны входил кардиолипин [1084]. Подобный эффект, по-видимому, обусловлен особенностями структуры кардиолипина, который состоит из двух остатков фосфатидных кислот, соединенных гибкой связкой (глицерином). Согласно представлениям, выдвинутому в нашей группе [126], кардиолипин может прикреплять белок к мембране, погружая два своих жирных ацила в гидрофобный домен белка, в то время как два других жирных ацила остаются в фосфолипидном слое мембраны.

Многие мембранные белки связываются с мембраной без помощи какого-либо специфического партнера. Примеры такого рода связывания показаны на рис. 7. В некоторых случаях почти вся молекула белка состоит из последовательностей гидрофобных аминокислот, образующих α -спиральные колонны, ориентированные поперек мембраны. Только короткие связи между колоннами и небольшие концевые участки составлены из гидрофильных аминокислот (см. рис. 7, а). Хорошо известный пример подобного белка — бактериородопсин. Этот белок укреплен в мембране как кирпич в стене. Из 248 аминокислотных остатков, образующих бактериородопсин, только 27 удается отщепить обработкой протеиназами, которые не только не удаляют бактериородопсин из мембраны, но даже не тормозят его активность как светозависимого протонного насоса [148].

Подобная организация типична для мембранных белков, имеющих дело с гидрофобными субстратами или с теми из гидрофильных субстратов небольшого размера, содержание которых в омывающем мембрану растворе достаточно велико. Если эти условия не выполняются, то субстратсвязывающий домен мембранного фермента обычно выступает в водную фазу далеко из мембраны. В таких случаях связь с ней может осуществляться за счет особенно гидрофобного домена («якоря») (см. рис. 7, б, в). Чтобы увеличить гидрофобность, в некоторых случаях имеет место специфическая модификация якорного домена, а именно аминокислотные остатки, содержащие гидроксильные группы, ацилируются жирными кислотами [418, 973]. Этот процесс происходит в аппарате Гольджи [973].

Другим местом модификации может быть N-конец полипептидной цепи. Так, N-концевой глицин в молекуле NADH-цитохром b_5 -редуктазы ацилирован миристиновой кислотой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$

СООН. Это дополнительно увеличивает сродство к жиру N-концевой последовательности фермента, образуемой гидрофобными аминокислотами [1155]. Муреиновый липопротеид, прикрепленный к внешней мембране *E. coli*, модифицирован пальмитатом, присоединенным по NH_2 -группе к N-концевому цистеину. Еще два остатка жирных кислот связаны с тем же цистеином через глицерин, который образует тиоэфирную связь.

Белки могут составлять от 1,6 до 2,3 вещества мембраны. В первом случае они находятся в броуновском движении в плоскости липидного бислоя, который служит главной составной частью мембраны. Движение белка прекращается при температуре ниже точки замерзания углеводородной сердцевины бислоя. Скорость латерального движения белков сильно снижается, если белки становятся главной составной частью мембраны, как это имеет место во внутренней мембране митохондрий.

* * *

В приведенной выше вводной главе мы не рассматривали таких общих физико-химических понятий, как свободная энергия, окислительно-восстановительные, Доннаны, Нернстовы и поверхностные потенциалы и т. п. Их можно найти в учебниках биохимии и биофизики, а применительно к мембранной биоэнергетике — в монографии Никольса [98].

Глава 2

Специфические методы мембранной биоэнергетики

В мембранной биоэнергетике используются практически все основные методы биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, биохимии и биофизики. Кроме того, целый ряд методических приемов был разработан специально для этой отрасли биологических наук. Наиболее существенные из них будут рассмотрены в настоящей главе.

2.1. Измерение мембранного потенциала ($\Delta\psi$)

Электрический мембранный потенциал ($\Delta\psi$) является той первичной формой энергии, которая вырабатывается $\Delta\bar{\mu}\text{I}$ -генераторами — протонными или натриевыми насосами.

Образующаяся $\Delta\psi$ тормозит работу $\Delta\bar{\mu}\text{I}$ -генератора, если $\Delta\bar{\mu}\text{I}$ не используется каким-либо из потребителей. Это явление, которое в общей форме можно назвать *ионным контролем*, а конкретно — *протонным* или *натриевым контролем*, возникает задолго до того, как будет создан градиент концентрации транспортируемого иона ($\Delta\mu\text{I}$). Такие соотношения суть следствие сравнительно малой электрической емкости мембраны по сравнению с омывающими ее рН-буферами (подробнее см. раздел 6.3). По этой причине измерение $\Delta\psi$ является одной из важнейших задач при исследовании мембранных энергопреобразующих систем.

Чтобы измерить $\Delta\psi$, образуемую $\Delta\bar{\mu}\text{I}$ -генератором, необходимо преодолеть по меньшей мере две трудности.

1. Важнейшие объекты исследования — органеллы эукариотических клеток или бактерии — так малы, а сопротивление их мембраны так велико, что оказывается невозможным надежное применение микроэлектродной техники, разработанной физиологами в опытах с крупными клетками животных, растений и грибов.

2. Несмотря на малый размер, органеллы и бактериальные клетки располагают множеством систем ионного транспорта, все детали которого в настоящее время просто невозможно учесть. Поэтому приходится прибегать к различного рода допущениям, применяя косвенные методы слежения за $\Delta\psi$.

Традиционный энзимологический подход, а именно очистка исследуемого фермента, сам по себе недостаточен, чтобы преодолеть эту трудность. Ведь очистка фермента — генератора или

потребителя $\Delta\bar{p}H$ с неизбежностью предполагает разрушение природной мембраны.

Чтобы измерить генерацию $\Delta\bar{p}H$ очищенным ферментом, необходимо его вновь встроить в мембрану, обладающую высоким электрическим сопротивлением. Реконструкция протеолипосом может решить эту проблему.

2.1.1. Протеолипосомы

Слово «протеолипосома» я предложил в 1973 г. для обозначения замкнутых мембранных пузырьков, образованных самосборкой из фосфолипидов и белков [1397]. В то время мы использовали протеолипосомы в опытах по доказательству хемосмотической гипотезы энергетического сопряжения [774, 1396]. За два года до этого Кагаве и Ракеру [804] удалось реконструировать замкнутые пузырьки из соевых фосфолипидов и одного из потребителей $\Delta\bar{p}H$, а именно H^+ —АТР-синтазы. Авторы фракционировали смесь белков митохондриальных мембран таким образом, что водорастворимый сектор H^+ —АТР-синтазы (фактор F_1) и мембранный сектор (F_0) были разделены и получены в чистом виде. Затем фактор F_0 растворили в детергенте (холате) и полученный раствор смешали с фосфолипидами, также растворенными в холате.

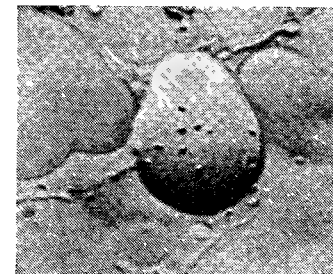
На следующем этапе детергент медленно удалили диализом. Понижение концентрации детергента при диализе сопровождалось самосборкой одномолекулярных замкнутых пузырьков наподобие липосом Банхэма [218], но содержащих в своей мембране помимо фосфолипидов еще и белок (фактор F_0). Последний этап — добавление водного раствора фактора F_1 к F_0 -протеолипосомам. Это имело следствием присоединение фактора F_1 к протеолипосомам в силу его высокого сродства к фактору F_0 . Полученный комплекс F_0F_1 , встроенный в мембрану протеолипосом, оказался способным расщеплять АТР. Скорость гидролиза ускорялась агентами, разрывающими $\Delta\bar{p}H$, как если бы АТР-разная реакция генерировала $\Delta\bar{p}H$.

Тот же «холатный» метод был затем использован в лаборатории Ракера и независимо в нашей группе, чтобы реконструировать протеолипосомы с цитохромоксидазой [728, 774] или бактериородопсином [824]. Наконец, были получены протеолипосомы, содержащие как $\Delta\bar{p}H$ -генератор (цитохромоксидазу или бактериородопсин), так и потребитель $\Delta\bar{p}H$ (факторы F_0F_1). В таких системах был продемонстрирован синтез АТР за счет энергии дыхания или света [488, 815, 1229].

Позднее многие другие генераторы и потребители $\Delta\bar{p}H$ были очищены и вставлены в протеолипосомы (см. обзоры: [428, 547, 1097, 1414]).

Рис. 8. Цитохромоксидазная протеолипосома

Метод замораживания и скалывания, электронная микроскопия (увеличение 61 000). Крупные молекулы цитохромоксидазы выступают из мембраны протеолипосомы (из работы Никольса [1110])



Электронная микрофотография цитохромоксидазных протеолипосом (метод замораживания и скалывания) приведена на рис. 8.

2.1.2. Прямое измерение генерации $\Delta\bar{p}H$ протеолипосомами, сорбированными на коллоидной пленке

В нашей лаборатории Л. А. Драчевым и соавт. [494] был разработан метод, позволяющий измерять непосредственно вольтметром генерацию $\Delta\bar{p}H$ ферментами, встроенными в протеолипосомы. Протеолипосомы сорбировали на одной из поверхностей коллоидной пленки, пропитанной декановым раствором фосфолипидов с добавкой октадециламина. Последнее вещество, заряженное положительно при нейтральных и кислых значениях pH, облегчает сорбцию протеолипосом, несущих в тех же условиях отрицательный заряд, обусловленный фосфолипидами.

Как показали опыты, проведенные в нашей группе И. И. Севериной [119, 1357], сорбция протеолипосом происходит таким образом, что содержащийся внутри них раствор не перемешивается с наружным раствором. По-видимому, при сорбции мембрана на той стороне протеолипосомы, которая контактирует с пленкой, растворяется пропитывающим пленку деканом, а мембрана на другой ее стороне сохраняется, отделяя омывающий пленку раствор от раствора внутри протеолипосом.

Генерация $\Delta\bar{p}H$ на мембране сорбированных протеолипосом может быть зарегистрирована двумя электродами, которые помещены по обе стороны коллоидной пленки и соединены с вольтметром (рис. 9).

Эквивалентная схема измерения приведена на рис. 10. Согласно схеме, $\Delta\bar{p}H$ -генераторы, встроенные в сорбированную протеолипосому, переносят заряды (скажем, H^+) через эту мембрану. Если поток H^+ направлен из раствора снаружи протеолипосомы в ее внутреннюю полость, эта последняя должна заряжаться положительно относительно обоих растворов, разделенных колло-

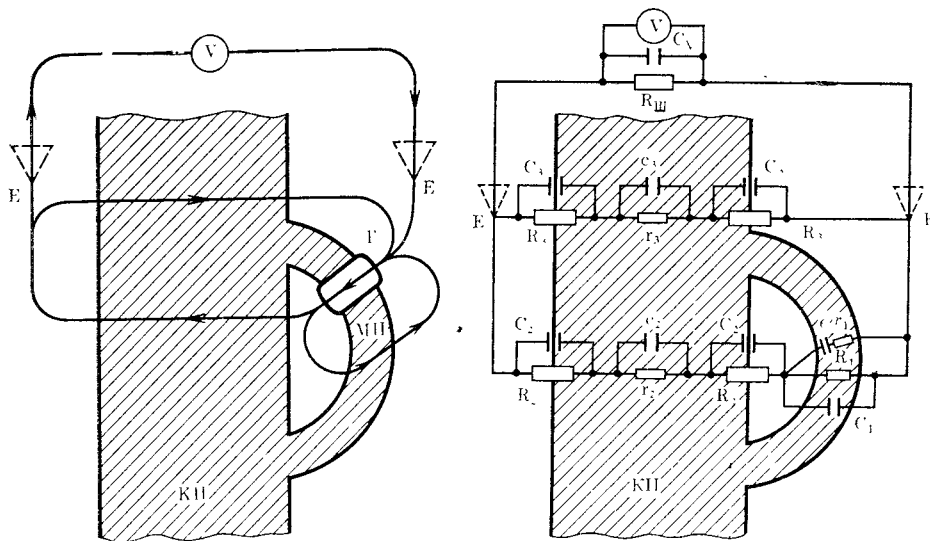


Рис. 9. Диаграмма электрических токов, генерируемых протеолипосомами, сорбированными на коллоидной пленке, пропитанной раствором фосфолипидов в декане

КП — коллоидная пленка, Е — электрод, Г — $\Delta\bar{p}H$ -генератор, МП — мембрана протеолипосомы, V — вольтметр

Рис. 10. Эквивалентная электрическая схема системы «протеолипосома — коллоидная пленка»

КП — коллоидная пленка; МП — мембрана протеолипосомы; ε и r_1 — электродвижущая сила и внутреннее сопротивление $\Delta\bar{p}H$ -генератора, V — вольтметр; Е — электрод; R_1 и C_1 — сопротивление и емкость мембраны и протеолипосом; R_2 — сопротивление поверхности раздела «коллоидная пленка/вода» в местах, покрытых протеолипосомами; r_2 — сопротивление внутренних областей коллоидной пленки в тех же местах; C_2 и c_2 — соответствующие емкости; R_3 , r_3 , C_3 и c_3 — сопротивления и емкости тех мест пленки, где нет протеолипосом; C_V — входная емкость вольтметра; $R_{ш}$ — сопротивление, шунтирующее коллоидную пленку

дией пленкой. Образованная таким образом $\Delta\bar{p}H$ должна делиться пропорционально сопротивлениям: 1) участков пленки, покрытых протеолипосомами (R_2), 2) свободных участков пленки (R_3) и 3) мембраны сорбированных протеолипосом (R_1).

В целом приведенная система может быть описана схемой компенсированного аттенюатора, поскольку константа времени покрытых протеолипосомами участков ($R_2 \cdot C_2$) равна таковой свободных участков ($R_3 \cdot C_3$), коль скоро и те и другие представляют собой части одной и той же коллоидной пленки. Поэтому электрический ответ, возникающий, скажем, при включении $\Delta\bar{p}H$ -

генератора, должен передаваться на электроды без искажения кинетики, хотя амплитуда ответа будет снижена².

Как показали опыты, сопротивление поверхности раздела липид/вода оказывается намного большим, чем сопротивление внутренней части коллоидной пленки, пропитанной фосфолипидом в декане. Именно поэтому деление $\Delta\bar{p}H$, образуемой $\Delta\bar{p}H$ -генератором, в системе «протеолипосома — коллоидная пленка», получается того же порядка, что в опытах, где протеолипосомы сорбировали на черной мембране. Кроме того, было найдено, что электрогенная активность $\Delta\bar{p}H$ -генераторов может быть измерена в «двухфазной» системе, состоящей из 1) деканового раствора фосфолипидов (верхний слой), 2) воды (нижний слой), 3) электродов, погруженных в каждый из слоев, и 4) протеолипосом или природных мембранных пузырьков, сорбированных на поверхности раздела фаз (рис. 11) [38, 39, 499].

В принципе есть два пути избежать деления $\Delta\bar{p}H$ при прямых ее измерениях. Можно попытаться воткнуть в протеолипосому электрод либо вызвать не сорбцию, а слияние протеолипосом с плоской бислойной мембраной. Первый из подходов был опробован группой Кагавы [803], применившей особый метод получения очень крупных (до 30 мкм в диаметре) протеолипосом с H^+ -АТФ-синтазой. Однако даже в этом случае микроэлектрод оказался слишком велик сравнительно с протеолипосомой (рис. 12), чтобы сделать возможным аккуратное измерение $\Delta\bar{p}H$. Другим недостатком микроэлектродов оказывается их высокое электрическое сопротивление, что принципиально не позволяет разрешать быструю кинетику генерации $\Delta\bar{p}H$.

Слияние протеолипосом с плоской черной мембраной, имеющее результатом встраивание $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в разделяющий два макрообъема фосфолипидный бислой, должно дать теоретически идеальную систему для прямого измерения $\Delta\bar{p}H$. В этом случае ионы H^+ , транспортируемые $\Delta\bar{p}H$ -генератором, количественно переносятся из одного макрообъема в другой. К сожалению, стабильность черной мембраны резко снижается при встраивании в нее белков. Это вряд ли удивительно, если вспомнить, что отношение диаметра отверстия, покрытого черной мембраной, к ее толщине обычно равно 10^5 . Поэтому любой беспорядок в упаковке фосфолипидов, неизбежно возникающий при встраивании в нее белков, резко повышает вероятность разрыва мембраны, которая, по-видимому, особенно велика в случае $\Delta\bar{p}H$ -генераторов.

² Следует отметить, что аттенюатор становится некомпенсированным, если входная емкость вольтметра оказывается того же порядка, что емкость C_2 . Такие соотношения возникают при сорбции протеолипосом на толстой плоской фосфолипидной мембране или миллипоровом фильтре, пропитанном фосфолипидами. В то же время коллоидная пленка и бислойная (черная) искусственная мембрана свободны от этого дефекта. Коллоидная пленка гораздо удобнее черной мембраны, будучи механически и электрически намного более стабильной конструкцией.

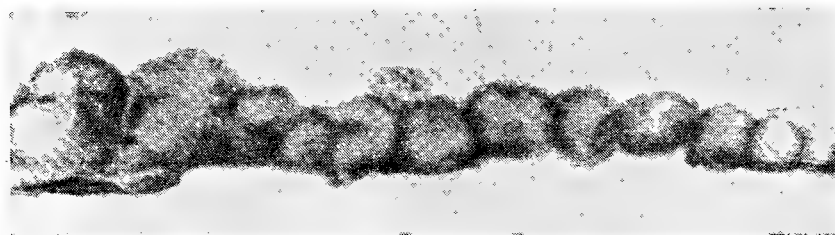


Рис. 11. Электронная микрофотография хроматофоров *Rh. rubrum*, сорбированных на поверхности раздела между декановым раствором фосфолипидов (верхний слой) и водным раствором (нижний слой)

Увеличение $2 \cdot 10^4$ [1404]

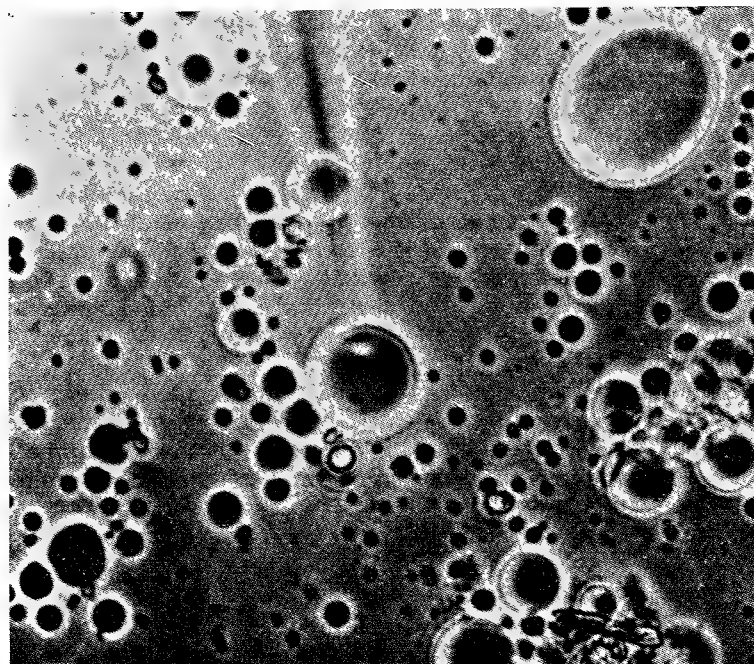


Рис. 12. Микроэлектрод, введенный внутрь крупной протеолипосомы, иммобилизованной на поверхности полилизина

Увеличение 650 (из Кагавы и соавт. [803])

Полипептидные цепи в таких белках несколько раз пересекают мембрану, вызывая множественные нарушения упаковки бислоя. Только белки со сравнительно простой функцией, такой, как образование пассивных ионных каналов или связывание с определенным лигандом (белки-рецепторы), удается воспроизводимо встроить

в черную мембрану и демонстрировать их активность. Авторы, время от времени сообщавшие о встраивании в черную мембрану $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, таких, как комплексы фотосинтетических реакционных центров, бактериородопсин или цитохромоксидаза, не в состоянии исключить весьма вероятную возможность, что исследуемые белки локализованы в протеолипосомах, прикрепленных к плоской мембране.

Следует подчеркнуть, что деление тока и напряжения в системах типа «протеолипосомы — коллоидная пленка» в общем-то не создает каких-либо принципиальных трудностей при изучении $\Delta\bar{p}H$ -генераторов. Конечно, в таких случаях измеряемая $\Delta\psi$ всегда оказывается ниже той, что реально образуется генератором. Однако, как показало специальное исследование, проведенное в нашей группе [486], подобное занижение не превышает двух раз, так что $\Delta\psi$ остается на вполне измеримом уровне. Что касается временного разрешения, то оно здесь не хуже, чем при встраивании белка в черную мембрану, и много лучше, чем при использовании микроэлектродов, будучи лимитированным только электрометром. В наших опытах разрешение составляло 50 нс, что значительно короче времени однократного срабатывания любого $\Delta\bar{p}H$ -генератора. Вот почему этим методом удастся следить не только за валовым процессом генерации $\Delta\psi$, но и за его отдельными этапами. Другими словами, можно регистрировать перемещение заряда (H^+ или электрона) внутри молекулы белка-генератора. Этот подход важен для понимания механизма генерации $\Delta\bar{p}H$. Он особенно плодотворен в тех системах трансформации энергии, которые могут быть очень быстро приведены в действие. Таковы светозависимые $\Delta\bar{p}H$ -генераторы.

Система «протеолипосомы — коллоидная пленка», первоначально разработанная для изучения бактериородопсина [57, 497, 1404, 1400], была затем использована при исследовании целого ряда других мембранных преобразователей энергии, таких, как бактериальные фотосинтетические центры и фотосистема I из хлоропластов [502], зрительный родопсин [61, 492]. Протеолипосомы, сорбированные на миллипоровских или тефлоновых фильтрах, были применены в опытах с цитохромоксидазой [488], H^+ -АТФ-синтазой [490], пирогидратазой [73, 871], трансгидрогеназой [60, 496]. Фактически во всех случаях без исключения, когда необходимо было измерить генерацию $\Delta\psi$, нам удалось достичь этой цели, используя названную систему. Метод был успешно взят на вооружение в ряде других лабораторий (см., например, [270, 940, 1368, 1506]). Он оказался применимым не только к протеолипосомам, но и к природным мембранным фрагментам, таким, как субмитохондриальные частицы [137, 876, 1190], бактериальные хроматофоры [226, 486, 502], частицы цитоплазматической мембраны бактерий [1032], фоторецепторные диски [24, 25, 492, 1364, 1365], бляшки, содержащие бактериородопсин [495, 496, 1411].

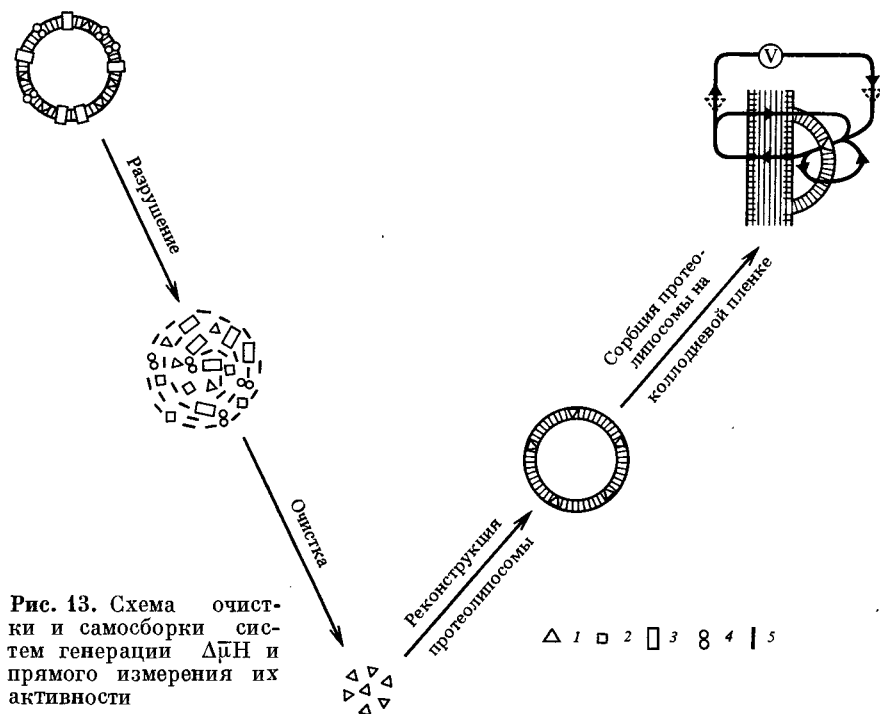


Рис. 13. Схема очистки и самосборки систем генерации $\Delta\Psi$ Н и прямого измерения их активности

1 — излучаемый $\Delta\Psi$ Н-генератор; 2, 3, 4 — другие мембранные белки; 5 — фосфолипид

Сказанное позволяет заключить, что предложенный метод достаточно универсален для изучения электрогенных биологических систем.

На рис. 13 дана общая схема изучения $\Delta\Psi$ Н-генерирующих устройств клетки, включающая их очистку и самосборку и завершающаяся прямым измерением преобразования ими световой или химической энергии в электрическую форму.

2.1.3. Измерение $\Delta\Psi$ в intactных клетках и органеллах

2.1.3.1. Микроэлектродный метод

Описанный выше подход, связанный с очисткой и самосборкой генераторов и потребителей $\Delta\Psi$ Н, позволяет ответить на два вопроса: способен ли данный фермент генерировать $\Delta\Psi$ и (в случае положительного ответа) каковы временные характеристики отдельных стадий этого процесса превращения энергии. Однако

список задач, касающихся изучения $\Delta\Psi$ Н-генераторов, не исчерпывается названными проблемами. Необходимо также понять, какое место в системе преобразования энергии клетки занимают исследуемые $\Delta\Psi$ Н-генераторы, как регулируется их активность, не нарушаются ли они при патологиях, а если такое нарушение происходит, то как можно его исправить, и т. д.

Для анализа всех этих проблем приходится исследовать не протеолипосомы, а intactные органеллы, клетки, органы и даже организмы. Кроме того, всегда желательно любые работы с модельными системами, такими, как протеолипосомы, сопровождать опытами на природных объектах, чтобы уменьшить риск артефактов.

К сожалению, прямое измерение электродами $\Delta\Psi$ на природных мембранах возможно только в очень ограниченном числе случаев. Электрод удастся ввести лишь в крупные эукариотические клетки с тем, чтобы измерить $\Delta\Psi$ на их внешней мембране. В то же время бактерии, митохондрии и хлоропласты, т. е. объекты, наиболее интересные с точки зрения биоэнергетики, слишком малы для применения микроэлектродного метода. По образному выражению Ракера [1225], ввести микроэлектрод в митохондрию — это все равно как попытаться засунуть бейсбольную биту в кошку. Сравнительные размеры очень тонкого микроэлектрода и протеолипосомы диаметром 20 мкм были проиллюстрированы выше на рис. 12. Как правило, диаметр бактерии или органеллы существенно меньше 20 мкм, так что введение микроэлектрода всегда сопряжено с сильными повреждениями исследуемого объекта и разрядкой $\Delta\Psi$ из-за короткого замыкания в месте прокола мембраны. Сопротивление энергопреобразующих мембран обычно очень высоко (гораздо выше, чем внешней мембраны животной клетки), и даже небольшое увеличение проводимости ведет к практически полному рассеянию $\Delta\Psi$. Именно этот эффект преследовал, по-видимому, Тедески [1499], который в течение многих лет безуспешно пытался измерить $\Delta\Psi$ электродом, введенным в митохондрию.

Однако применительно к другим системам в литературе можно найти несколько указаний на положительный результат измерения $\Delta\Psi$ микроэлектродами.

Хронологически первым среди них было сообщение А. А. Булычева и соавт. из МГУ [331, 332]. Авторы ввели микроэлектрод в гигантский хлоропласт в клетке эукариотической водоросли и измерили светозависимую генерацию $\Delta\Psi$. Позднее Хадер [668] провел аналогичные измерения на крупных многоклеточных цианобактериях. В лаборатории Слеймзна зависящая от дыхания $\Delta\Psi$ была измерена микроэлектродом, введенным в клетку штамма *E. coli*, который отличался сравнительно большим диаметром, чем дикий тип той же бактерии. В дальнейшем, однако, у авторов возникли трудности с воспроизведением этого эксперимента.

Ни одна из упомянутых выше систем не стала общепринятой моделью, и только работа А. А. Булычева и соавт. была воспроизведена в другой лаборатории [1562].

Коллоидная пленка не может быть использована в опытах с интактными бактериями, митохондриями и хлоропластами, так как во всех этих случаях прямому контакту с внутренней мембраной мешает клеточная стенка или внешняя мембрана клетки (органеллы). Эта трудность, по-видимому, присуща и методу «пэчча», когда микроэлектрод прикасается к исследуемой мембране, не протыкая ее.

2.1.3.2. Природные проникающие ионы и ионофоры

Пытаясь проверить постулат хемиосмотической теории о генерации $\Delta\psi$ на сопрягающих мембранах, Митчел измерял распределение ионов K^+ между инкубационной средой и митохондриями [1047, 1062] или бактериями [1330]. Для повышения калиевой проницаемости мембран добавлялся ионофор валиномицин. Электрофоретическое поглощение ионов K^+ митохондриями или бактериями регистрировалось по уменьшению в среде концентрации K^+ , измеряемой чувствительным к K^+ стеклянным электродом. В некоторых более поздних работах ион K^+ был заменен ионом радиоактивного рубидия. Аккумуляцию последнего измеряли по включению радиоактивности в митохондрии (бактерии) [1274].

Недостаток обоих этих методов состоит прежде всего в том, что и митохондриальная и бактериальная мембраны содержат K^+ / H^+ -антипортеры. Такие системы, обменивающие K^+ (или Rb^+) на H^+ , были постулированы Митчелом [1045, 1046], а затем описаны рядом авторов (см.: [249, 1330]). Они могут маскировать транспорт K^+ (Rb^+) под действием электрического поля. Ситуация дополнительно усложняется, тем, что $\Delta\psi$ активизирует K^+ / H^+ -антипорт [249].

Другая трудность состоит в том, что бактерии и органеллы могут располагать АТРазами механизмами аккумуляции ионов K^+ . K^+ -транспортирующая АТРаза была обнаружена, например, в клетках *E. coli*, выращенных в среде с очень низкой $[K^+]$ (см. ниже раздел 7.7).

Еще одно ограничение метода, использованного Митчелом, — это то, что его нельзя применить к мембранным образованиям, внутренность которых заряжается не отрицательно (как в случае митохондрий и бактерий), а положительно. Таковы тилакоиды хлоропластов, бактериальные хромофоры, а также «вывернутые» субмитохондриальные и суббактериальные пузырьки. При включении $\Delta\mu H$ -генераторов все они электрофоретически выбрасывают K^+ из своего внутреннего объема наружу, где K^+ сильно разбавляется инкубационной средой, объем которой обычно превосходит более чем в 1000 раз суммарный объем исследуемых мембранных пузырьков в пробе.

2.1.3.3. Синтетические проникающие ионы

Трудности, перечисленные в предшествующем разделе, можно обойти, если использовать синтетические проникающие ионы вместо природного K^+ или близкого к нему по свойствам Rb^+ . При поиске таких ионов главная проблема сводилась к тому, чтобы преодолеть непроницаемость энергопреобразующих мембран для гидратированных ионизованных соединений. Мембраны этого типа пропускают только очень узкий круг природных ионов, для которых есть специальные переносчики, или каналы. Чужеродные ионы не имеют своих переносчиков, и потому гидрофобная сердцевина мембраны служит для них практически непреодолимым барьером.

Чтобы решить вопрос, требовалось найти ионы с низкой степенью гидратации и потому с высокой растворимостью в жиру. Как показало исследование, проведенное лабораториями Е. А. Либермана и нашей [82, 208, 648, 758, 935, 936], такие свойства присущи синтетическим ионам, заряд которых делокализован по всей ионизованной молекуле или экранирован гидрофобными заместителями.

Чтобы отобрать такие вещества, большой круг соединений был проверен в опытах с черными мембранами. Предполагалось, что добавление соли проникающего катиона (X^+) и непроницаемого аниона (например, Cl^-) в один из отсеков, разделенных мембраной, должно создавать диффузионный электрический потенциал (отрицательное зарядение отсека, содержащего XCl). Этот эффект должен возникать вследствие движения X^+ из отсека, куда он добавлен, в противоположный отсек. В случае соли непроницаемого катиона и проникающего аниона можно ожидать появления потенциала обратного знака.

В опытах, поставленных по этому плану, удалось обнаружить несколько веществ, отвечающих приведенным выше требованиям. Формулы некоторых из них показаны на рис. 14.

Наиболее наглядным оказалось сравнение тетрафенилфосфония и тетрафенилбората, соединений, отличающихся только ионизованным атомом (P^+ в первом и B^+ во втором случае). Оба иона генерировали разность диффузионных потенциалов, направление которой свидетельствовало, что производное P^+ — проникающий катион, а производное B^+ — проникающий анион.

Особенно высокой была проницаемость черной мембраны для анионов фенилдикарбаундекабората. Именно это вещество было затем использовано при изучении различных природных мембранных систем и протеолипосом. Кроме того, было найдено, что фенилдикарбаундекаборат и ТФБ⁻ сильно повышают проницаемость бислойных мембран для синтетических катионов.

Отобрав проникающие ионы в опытах с черными мембранами, мы затем испытали их на митохондриях и вывернутых субмито-

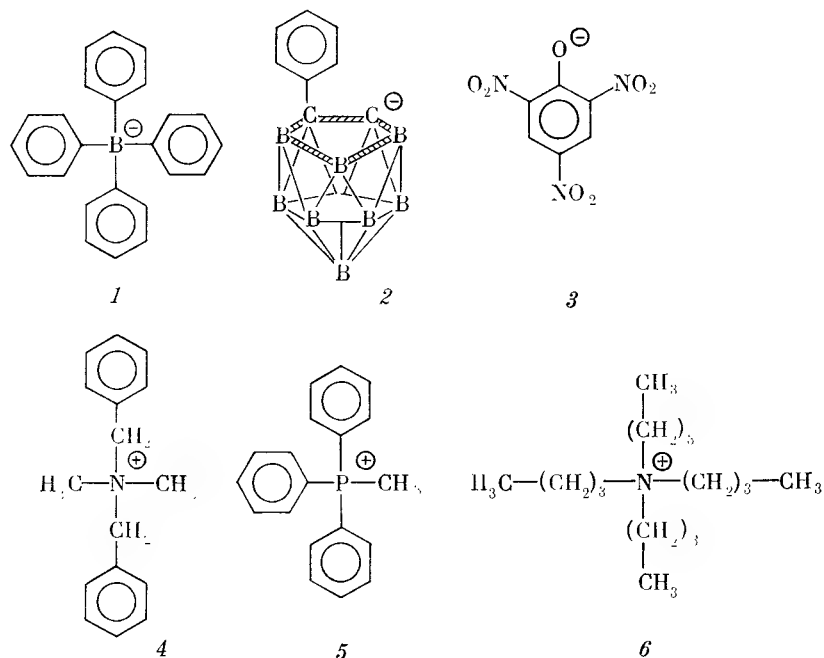
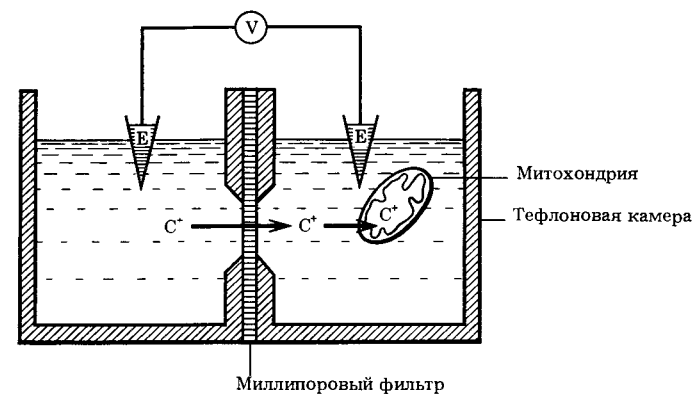


Рис. 14. Синтетические проникающие ионы

1 — ТФБ⁺; 2 — фенилдикарбаундекаборат; 3 — тринитрофенол-анион; 4 — N,N-дифенил, N,N-диметиламмоний; 5 — ТФМФ; 6 — тетрабутиламмоний

хондриальных пузырьках, имеющих противоположную митохондриям ориентацию мембраны. Можно было надеяться, что синтетические проникающие ионы будут диффундировать сквозь те участки митохондриальной мембраны, которые представляют собой фосфолипидный бислой, аналогичный черной мембране. В этом случае ионы должны были бы распределяться между, скажем, митохондрией и средой в соответствии с $\Delta\Psi$, генерируемой этой органеллой или ее вывернутыми частицами. Другими словами, катионы должны были накапливаться в митохондриях, а анионы — в вывернутых частицах. Именно такие соотношения и были обнаружены в опытах [208, 648, 936].

Чтобы следить за концентрацией проникающих ионов в инкубационной среде, Либерман и соавт. [936] предложили использовать ту же самую черную мембрану, которая была применена для поиска проникающих ионов. Митохондрии добавляли в один из двух отсеков тefлоновой ячейки, разделенной перегородкой с отверстием, затянутой черной мембраной. В оба отсека вносили проникающий катион. Энергизация митохондрий, например при включении дыхания, вызывала поглощение катиона органел-

Рис. 15. Устройство для измерения мембранного потенциала в митохондриях посредством синтетического проникающего иона (C^+)

V — вольтметр, E — электрод (по: Либерман и соавт. [936])

лами. В результате концентрация катионов в отсеке с митохондриями снижалась, что вызывало перемещение катионов через черную мембрану из того отсека, где митохондрий не было. Диффузионный потенциал, возникающий вследствие этого на черной мембране, регистрировали электродами, погруженными в оба отсека.

Описанный метод был впоследствии усовершенствован в нашей группе [496, 1404], когда нестабильную черную мембрану заменили миллипоровым фильтром, пропитанным декановым раствором фосфолипидов (рис. 15). Недавно были изготовлены ионоселективные электроды, чувствительные к ТФФ⁺ [812, 48] и ТФБ⁻ [819]. Это еще более упростило процедуру измерения $\Delta\Psi$.

Когда стали доступны радиоактивные проникающие ионы, оказалось возможным определять $\Delta\Psi$ по включению метки, скажем, во фракцию митохондрий [1276].

В течение последнего десятилетия метод проникающих ионов был применен для обнаружения $\Delta\Psi$ во многих работах на митохондриях, бактериях, хроматофорах, тилакоидах и их частицах, а также других природных и реконструированных системах. Такая универсальность неудивительна, так как основное требование к объекту исследования сводится к наличию участков фосфолипидного бислоя в исследуемой мембране. Это требование всегда выполняется в случае как природных, так и модельных мембранных образований.

Сложности возникают обычно при попытках применить метод проникающих ионов для точного измерения величины $\Delta\Psi$, образуемой ΔpH -генераторами. Здесь следует иметь в виду, что гидрофобность используемых ионов, позволяющая им пересекать мембрану, предопределяет большое сродство этих ионов к мембране.

Поэтому проникающий катион не только аккумулируется, скажем, внутри митохондрий, но также насыщает ту сторону мембраны, которая омывается внутримитохондриальным раствором. В результате количественный аспект метода оказывается не столь простым, как в случае ионов K^+ , которые в присутствии валиномицина электрофоретически перемещаются из инкубационной среды во внутримитохондриальный раствор. И тем не менее метод синтетических ионов вытеснил хронологически предшествовавший ему калиевый метод. Главной причиной этого явилось то обстоятельство, что применение синтетических ионов позволяет преодолеть главную трудность, сопряженную с использованием природных ионов, которые могут вовлекаться в процессы иные, чем трансмембранный электрофорез. Кроме того, метод синтетических ионов отличается намного большей чувствительностью, чем калиевый.

В принципе, сродство каких-либо компонентов мембраны к гидрофобным ионам может меняться при энергизации. Если это имеет место, распределение ионов будет зависеть от $\Delta\psi$ более сложным образом, чем то следует из уравнения Нернста. Чтобы быть уверенным, что такого рода эффект не изменил знак ответа синтетических ионов, следует измерить другую составляющую $\Delta\bar{p}H$, а именно ΔpH . При этом предсказание состоит в том, что отсек, аккумулирующий синтетические катионы, например внутренний объем митохондрий, становится щелочнее в условиях, когда происходит транспорт катионов. (Такие соотношения должны иметь место потому, что аккумуляция катиона вызвана работой $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, откачивающих H^+ из митохондрий в инкубационную среду.) Если данное требование выполняется, можно быть вполне уверенным, что снижение концентрации синтетического иона в среде отражает появление $\Delta\psi$.

Что касается абсолютного значения $\Delta\psi$, то для его расчета следует в тех же условиях опыта применить также и какой-либо другой метод, например калиевый. Если оба метода дадут совпадающие результаты, то это сильно повысит надежность измерения, поскольку ограничения двух методов совершенно различны.

Иногда сродство мембраны к гидрофобным ионам меняется $\Delta\psi$ -независимым образом при включении исследуемого энергодляющего процесса, например дыхания [438]. Этот эффект можно легко обнаружить, поскольку он должен быть нечувствителен к агентам, специфически снижающим $\Delta\psi$, таким, как валиномицин в присутствии K^+ .

В следующих особых случаях метод синтетических ионов оказывается неприменимым.

1. Синтетический ион сильно тормозит исследуемый $\Delta\bar{p}H$ -генератор; это явление встречается сравнительно редко, так как в силу высокой чувствительности метода можно использовать низкие концентрации иона.

2. Ион метаболизируется или взаимодействует с каким-либо из переносчиков, присутствующих в клетке либо органелле. Так, было показано, что ТФБ⁻ может служить донором электронов для фотосистемы II в хлоропластах. У одного из видов дрожжей трифенилметилфосфоний переносится системой транспорта тиамина [213, 227]. Имеются косвенные указания на энергозависимый выброс этого катиона из клеток *Acinebacter calcoaceticus* и *E. coli* [1030].

3. Объект исследования содержит две сопрягающие мембраны, генерирующие $\Delta\psi$ противоположного знака. Именно так обстоит дело у некоторых фотосинтезирующих бактерий, содержащих суспендированные в цитозоле хроматофоры. В этом случае как цитоплазматическая мембрана, так и мембрана хроматофора несут $\Delta\psi$ со знаком минус в цитозоле.

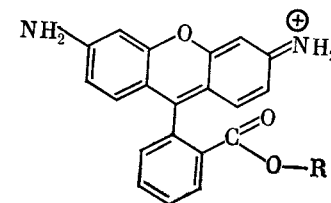
2.1.3.4. Флюоресцирующие проникающие ионы:

наблюдение за $\Delta\psi$ в отдельной клетке и органелле

В лаборатории Чена и др. [374, 430, 781] и независимо в нашей группе [95, 1359, 15161] был разработан метод наблюдения за образованием $\Delta\psi$ в отдельной клетке или митохондрии. С этой целью применили флюоресцирующие производные проникающих синтетических катионов, а именно этилродамин и метилродамин (другое название родамин 123) (рис. 16).

Рис. 16. Алкилированный родамин — флюоресцирующий проникающий катион

R — может быть метилом или этилом



Принцип подхода состоит в следующем. При энергизации митохондрии или бактерии аккумулируют любой проникающий катион, поскольку их внутренность заряжается отрицательно. Если катион способен флюоресцировать, можно наблюдать флюоресценцию отдельной бактериальной клетки или митохондрии под микроскопом.

Опыты, проведенные в нашей группе И. И. Севериной [95], показали, что катионные формы упомянутых выше производных родамина пересекают черную мембрану, генерируя диффузионный потенциал. Чен и соавт. в США [374, 430, 781] и И. А. Воробьев и Д. Б. Зоров в нашей лаборатории [1561] показали, что алкилродамины вызывают прижизненную окраску митохондрии в различных типах животных клеток. Л. Е. Бакеева и соавт. [4] продемонстрировали, что в клетках культуры человеческих

фибробластов, прокрашенных этилродамином, светятся только митохондрии, причем в определенных условиях, когда митохондрии имеют нитчатую форму, можно наблюдать свечение всех без исключения митохондрий в исследуемом образце. Этот последний результат был получен путем сопоставления фотографий одной и той же клетки под флюоресцентным и электронным микроскопами.

Флюоресцентный метод создает уникальную возможность наблюдать непосредственно в живой клетке за энергизацией тонких нитчатых митохондрий, не видимых в световой микроскоп любым другим способом. Это и не удивительно, так как флюоресцирующая частица будет видна как источник света даже в том случае, если ее размер меньше длины волны видимого света. Так, ночью мы видим свет звезд, хотя они слишком мелки с точки зрения земного наблюдателя, чтобы быть видимыми днем как тела, поглощающие свет.

Используя этот метод, нам удалось доказать кабельную функцию нитчатых митохондрий, способных передавать электроэнергию из конца в конец клетки [4, 55] (подробнее см. раздел 6.2.4.4).

В других опытах нашей группы этилродамин был использован чтобы следить за кинетикой образования и рассеяния $\Delta\Psi$ в отдельной клетке трихома цианобактерий. Флюоресценцию измеряли микрофлюориметром. Результаты типичного опыта показаны на рис. 17. Генерацию $\Delta\Psi$ на цитоплазматической мембране клетки цианобактерии вызывали включением света, запускающего фотосинтез. Начальное обратимое снижение $\Delta\Psi$ обусловлено передачей вдоль трихома сигнала фототаксиса, зависящего от Ca^{2+} [668]. Дальнейший устойчивый уровень $\Delta\Psi$ поддерживается энергией света, поглощенного фотосинтетическими ΔpH -генераторами.

2.1.3.5. Каротиноидный сдвиг

У некоторых фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов образование $\Delta\Psi$ вызывает небольшой сдвиг максимума поглощения каротиноидов, а также хлорофилла [17, 45, 46, 531, 694, 764, 765, 792, 793, 1321, 1548, 1620]. Этот электрохромный эффект может быть показан как при естественной (энзиматической), так и при искусственной генерации $\Delta\Psi$. Преимущество метода состоит в том, что он позволяет регистрировать изменения $\Delta\Psi$ способом, не требующим никаких внешних воздействий на исследуемую систему. Однако метод имеет и свои весьма серьезные ограничения. Измеряя электрохромный сдвиг, мы не можем различать трансмембранное поле, направленное поперек мембраны, от локальных полей, электрический вектор которых может быть наклонен под любым углом к плоскости мембраны. Например, было показано, что изменения поверхностного потенциала вызы-

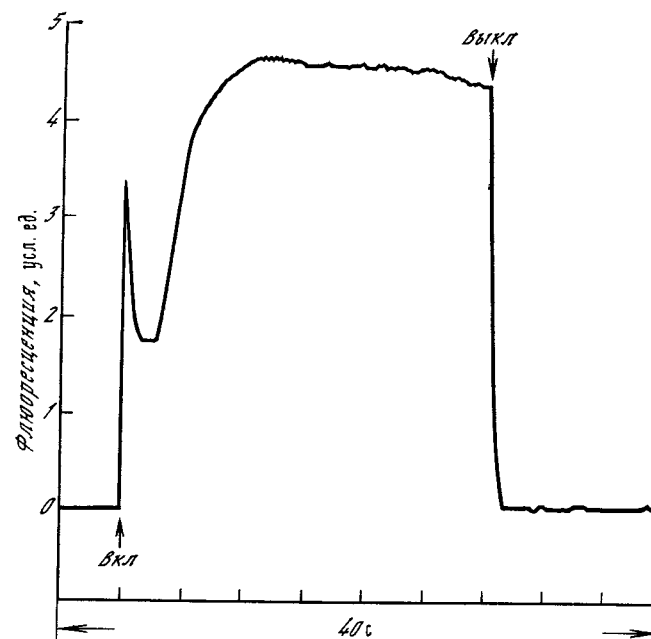


Рис. 17. Кинетика генерации $\Delta\Psi$ [в одной из клеток трихома цианобактерии *Phormidium uncinatum*, измеренная микрофлюориметром]

В качестве красителя использован этилродамин (по: Броун и соавт.[30])

вают каротиноидный сдвиг [62, 760]. Кроме того, этот метод не применим к протеолипосомам и громадному большинству природных мембран.

Сравнение каротиноидного метода с прямым измерением $\Delta\Psi$ и методом проникающих ионов можно найти соответственно в работах [486] и [384].

Что касается прочих методов измерения $\Delta\Psi$, то они либо весьма косвенны, либо применимы только к очень узкому кругу объектов.

2.2. Измерение ΔpH

Если «протонная» энергопреобразующая мембрана проницаема для любого иона кроме H^+ , то первичная форма ΔpH (электрический потенциал) превращается в разность pH между двумя объемами, разделенными мембраной. Простейший способ следить за ΔpH состоит в измерении концентрации водородных ионов снаружи клеток, органелл или протеолипосом.

Если, скажем, ΔpH -генераторы митохондрий экспортируют H^+ из матрикса в инкубационную смесь, то увеличение концент-

рации H^+ в этой смеси может быть зарегистрировано стеклянным рН-электродом при условии, что концентрация рН-буфера в среде низкая [1274]. В таком случае, как было найдено, митохондрии выделяют H^+ в количестве, достаточном для измеримого сдвига рН в инкубационной среде, несмотря на сильное разбавление выделяющихся ионов, происходящее из-за того, что объем митохондриального матрикса составляет обычно не более 0,1% общего объема смеси. Такое измерение оказывается возможным благодаря большой буферной емкости матрикса. Подобные соотношения характерны и для бактерий. В случае протеолипосом приходится добавлять непроникающий рН-буфер в смесь для их реконструкции. Затем внешний буфер отмывают переосаждением протеолипосом в среде без буфера.

Чтобы измерять сдвиги рН быстрее, чем это делает стеклянный электрод, применяют непроникающие рН-индикаторы. По изменению поглощения света индикатором (или его флуоресценции) при протонировании можно судить, например, о выделении H^+ -ионов энергизованными митохондриями. Среди рН-индикаторов, отвечающих на изменение рН спектральным сдвигом, можно упомянуть *n*-нитрофенол и пиранин [239, 633]. Умбеллиферон может служить примером флуоресцирующего рН-индикатора [654, 959].

Зная величину изменения рН снаружи пузырька, мы можем рассчитать сдвиг рН в его внутреннем объеме. Для такого расчета необходимо измерить объем пузырька и рН-буферную емкость заключенного в нем раствора (метод см.: [1062]).

Другой способ следить за вариациями внутреннего рН связан с измерением распределения проникающих слабых кислот или оснований между средой и пузырьком. Дело в том, что защелачивание внутренности пузырька ведет к поглощению слабой кислоты, если ее нейтральная (протонированная) форма проникает, а ионизованная (депротонированная) форма не проникает через мембрану. Соответственно закисление пузырька будет иметь следствием накопление в нем слабого основания при условии, что из двух его форм только нейтральная (непротонированная) способна пересечь мембрану.

В качестве проникающей слабой кислоты можно использовать ^{14}C -уксусную, бензойную или салициловую кислоты [1274]. В последнем случае применяют также специальный электрод, чувствительный к салицилату. Если в ту же экспериментальную камеру поместить еще и ТФФ $^+$ -чувствительный электрод, то можно следить одновременно за $\Delta\psi$ и ΔpH [1355].

В тех случаях, когда для измерения ΔpH требуется слабое основание, можно взять [^{14}C]-метиламин [1274]. Существует также оптический метод, позволяющий следить за накоплением проникающего слабого основания. Мембранные пузырьки, накапливающие ионы H^+ , поглощают флуоресцирующее слабое осно-

вание аттебрин [824]. При его аккумуляции внутри пузырька молекулы этого вещества собираются в комплексы, что сопровождается гашением флуоресценции.

Следует подчеркнуть, что аттебрин нельзя использовать для измерения ΔpH обратного знака (защелачивание внутреннего объема). Выходя из пузырька, он разбавляется в «океане» инкубационной смеси и образования комплексов не происходит.

2.3. Измерение быстрых процессов протонирования—депротонирования

Очевидно, что любой процесс переноса ионов H^+ через мембрану складывается из поглощения H^+ с одной стороны мембраны, транслокации H^+ сквозь гидрофобный барьер и выделения H^+ на противоположной стороне мембраны. Следить за перемещением протонов или электронов внутри мембраны можно, измеряя $\Delta\psi$ (см. предыдущий раздел). Что же касается переноса H^+ из воды в мембрану и из мембраны в воду, то здесь применяют быструю регистрацию спектральных сдвигов рН-индикаторов.

Быстрые электрические и рН-измерения требуют одновременного срабатывания всех молекул ΔpH -генераторов в исследуемой системе. В случае светозависимых ΔpH -генераторов это может достигаться применением лазерной вспышки с длительностью меньшей, чем время одного оборота генератора. Например, однократное срабатывание бактериородопсина происходит за 10 мс, причем две главные электрогенные стадии процесса занимают порядка 0,1 мс и 10 мс. Для изучения этого ΔpH -генератора мы применили лазер с временем вспышки порядка 30 нс. Чтобы следить за кинетикой выделения и поглощения ионов H^+ бактериородопсином, мы измеряли поглощение света рН-индикатором *n*-нитрофенолом в суспензии пурпурных бляшек — открытых фрагментов цитоплазматической мембраны галобактерий, содержащих бактериородопсин. Поскольку отщепление H^+ от бактериородопсина под действием света происходит на два порядка быстрее, чем последующее присоединение H^+ с другой стороны бляшки, рН-ответ на одиночную вспышку лазера выглядел как временное закисление среды, появляющееся за 0,1 мс и исчезающее за 10 мс [498]. (Подробнее см. ниже раздел 3.5.6.1.) Важный технический момент обнаружился при исследовании быстрых изменений рН. Оказалось, что при временах, короче 1 мс, скорость ответа рН-индикатора лимитируется диффузией H^+ -ионов от бактериородопсина к *n*-нитрофенолу. Как показали опыты, этот процесс резко ускоряется в присутствии рН-буфера. Поэтому инкубационная смесь при измерениях рН-ответов бактериородопсина была дополнена небольшим количеством (4 мМ) рН-буфера — морфолиноэтансульфоната [498].

Проблема измерений кинетики транспорта H^+ резко усложняется в случае $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, использующих химическую энергию, а не свет. Чтобы быстро включить такой генератор, требуется светочувствительное вещество, служащее либо предшественником субстрата (или активатора), либо ингибитором исследуемого фермента. Применение такого подхода ограничивается требованием, чтобы процесс превращения предшественника в субстрат под действием света сам по себе не сопровождался изменением рН. Это ограничение отсутствует, если измеряется не выделение или поглощение H^+ , а $\Delta\Psi$.

Многие мембранные преобразователи энергии содержат разного рода группы, поглощающие свет. Таковы не только пигменты фотосинтеза, но и геммы цитохромов, флавины и некоторые другие группировки редокс-ферментов. Изменения спектров поглощения или флюоресценции этих групп служат полезным оружием анализа быстрой кинетики транспорта зарядов. В некоторых случаях с той же целью измеряют поглощение или флюоресценцию ароматических аминокислотных остатков в белках — преобразователях энергии.

Итак, в гл. 2 мы рассмотрели ряд методических приемов, специфичных для исследований по энергетике биологических мембран. За рамками этого рассмотрения остались методы, обычные для энзимологии, биофизики, молекулярной биологии, биоорганической химии и генетики, необходимые в наши дни для проведения любого исследования биоэнергетического плана. Многие из них можно найти в сборниках [1020a]. Некоторые специальные методы, используемые при анализе определенных белков — преобразователей энергии, будут рассмотрены по ходу изложения в последующих разделах.

Глава 3

Первичные $\Delta\bar{p}H$ -генераторы

Первичными $\Delta\bar{p}H$ -генераторами называются системы, образующие протонный потенциал за счет энергетических ресурсов, поступающих в клетку извне, таких, как свет или субстраты окисления и кислород. Эти системы следует отличать от вторичных $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, использующих АТР, PP_i , градиенты растворимых веществ, преобразованные за счет использования $\Delta\bar{p}H$ или механизмов субстратного фосфорилирования.

3.1. Циклическая светозависимая редокс-цепь фотосинтезирующих бактерий

У бактерий энергия света может быть использована для образования $\Delta\bar{p}H$ посредством одного из трех механизмов: циклической редокс-цепи, нециклической редокс-цепи или бактериородопсина. В этой главе будет рассмотрена первая из названных систем.

3.1.1. Основные компоненты и принцип их действия

У пурпурных фотосинтезирующих бактерий (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rps. viridis*, *Chromatium vinosum* и некоторых других) описан циклический светозависимый процесс, единственным полезным продуктом которого является $\Delta\bar{p}H$. Этот процесс локализован в цитоплазматической мембране или в хроматофорах, мелких сферических мембранных пузырьках диаметром около 50 нм, взвешенных в цитозоле бактериальной клетки.

Свет поглощается магнийпорфирином — бактериохлорофиллом (рис. 18), связанным с особым белком (этот комплекс называется светособирающей антенной), или дополнительными пигментами — каротиноидами, локализованными в той же мембране и передающими энергию возбуждения на бактериохлорофилл антенны. Возбуждение мигрирует по молекулам антенного бактериохлорофилла, пока не достигнет так называемой специальной пары — димера бактериохлорофилла, связанного с другим белком.

Белок, о котором идет речь, содержит помимо димера две молекулы мономерного бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина, т. е. аналога бактериохлорофилла, лишённого иона Mg^{2+} , и две молекулы убихинона (CoQ) либо одну молекулу убихинона и одну молекулу менахинона (рис. 19). Весь этот

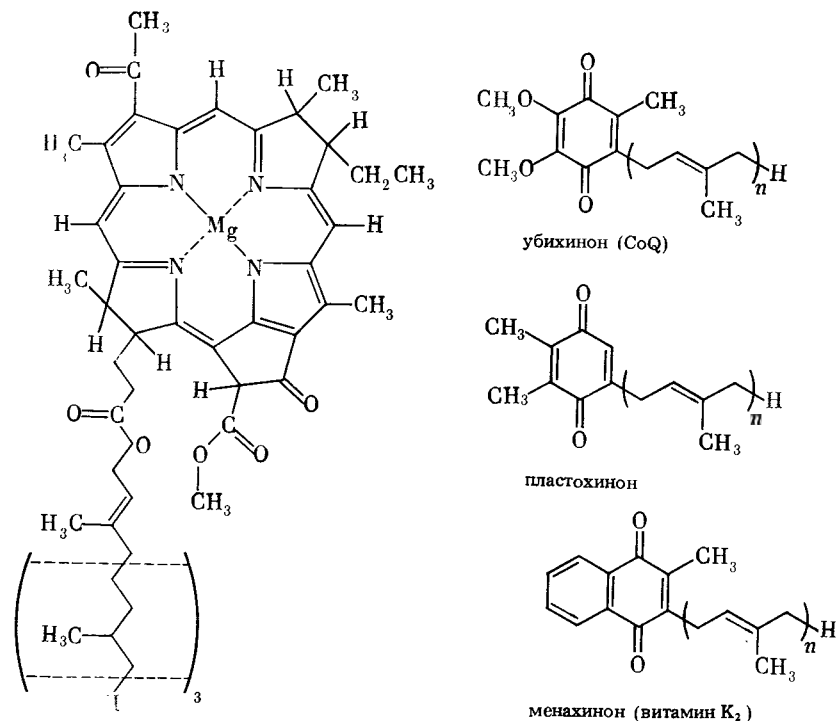


Рис. 18. Бактериохлорофилл *a* — сложный эфир производного магнийпорфирина и гидрофобного двадцатуглеродного спирта фитола

Рис. 19. Производные хинона, участвующие в ферментативных окислительно-восстановительных процессах

Число изопреноидных остатков (n) варьирует у разных видов от 6 до 10. Уби- и менахиноны найдены в мембранах бактерий и митохондрий, пластохинон — в мембранах тилакоидов хлоропластов и цианобактерий

комплекс носит название фотосинтетического реакционного центра. Количество реакционных центров обычно на два порядка меньше, чем антенного бактериохлорофилла.

Возбужденный димер бактериохлорофилла передает электрон убикинону (CoQ). Этот процесс ориентирован поперек мембраны и протекает в направлении ее цитоплазматической стороны. Он включает ряд промежуточных этапов, на которых происходит последовательное восстановление и окисление мономера бактериохлорофилла, бактериофеофитина и связанных мета(уби)хинонов. На схеме циклической редокс-цепи (см. ниже рис. 23) эти этапы соответствуют реакциям 1—4.

Чтобы восстановиться, CoQ должен присоединить два электрона и два протона (рис. 20). В стационарных условиях работы один

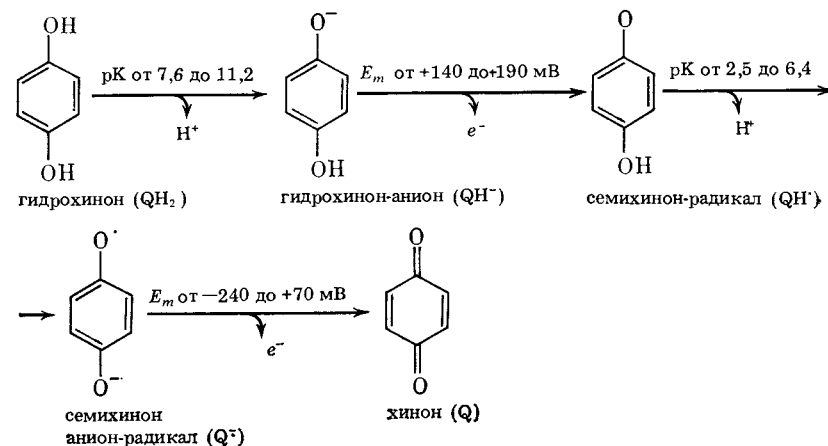


Рис. 20. Этапы превращения гидрохинона в хинон

Над стрелками указаны величины рК и редокс-потенциалов (E_m) для CoQ₁₀, измеренные в 80%-ном этаноле или в нативных мембранах. Видно, что, несмотря на значительные вариации этих параметров, рК пары QH₂/QH⁻ выше, чем рК пары QH[•]/Q^{•-}, а E_m пары QH[•]/QH⁻ выше, чем пары Q^{•-}/Q (по: Рич [1250])

из электронов поставляется реакционным центром, а другой — гемом *b* (рис. 21) цитохрома *b*. (Цитохромами называются гем-содержащие белки, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Цитохромы, имеющие идентичные гемы, но разные белковые части, обычно обозначают одной и той же буквой, но разными цифровыми индексами.) Приняв электроны, CoQ присоединяет и протоны, которые черпаются из ближайшей водной фазы (на рис. 23 — над мембраной). Образование CoQH₂ описывается реакцией 5 на том же рисунке.

Образовавшись, CoQH₂ перемещается в направлении противоположной стороны мембраны (на рис. 23 этот процесс обозначен волнистой стрелкой 6). Примерно на полпути от одной поверхности мембраны к другой CoQH₂ окисляется в семихинонную форму (реакция 7) посредством негемового железосульфопротеида, сокращенно обозначаемого FeS (структура различных FeS центров показана на рис. 22). CoQH₂ теряет при окислении два протона, которые затем переносятся в воду, расположенную на рис. 23 под мембраной. Что касается электрона, перешедшего с CoQH₂ на FeS, то он используется в конечном итоге для восстановления димера бактериохлорофилла, окисленного на первом этапе цикла. В переносе электрона от FeS к (БХл)₂⁺ (реакции 8—10) участвуют цитохромы типа *c* (для Rh. rubrum, где данная реакция хорошо изучена, это цитохромы *c*₁ и *c*₂).

CoQ^{•-}, получающийся из CoQH₂ при потере последним одного электрона и двух протонов, восстанавливает гем *b*₁ (реакция 11).

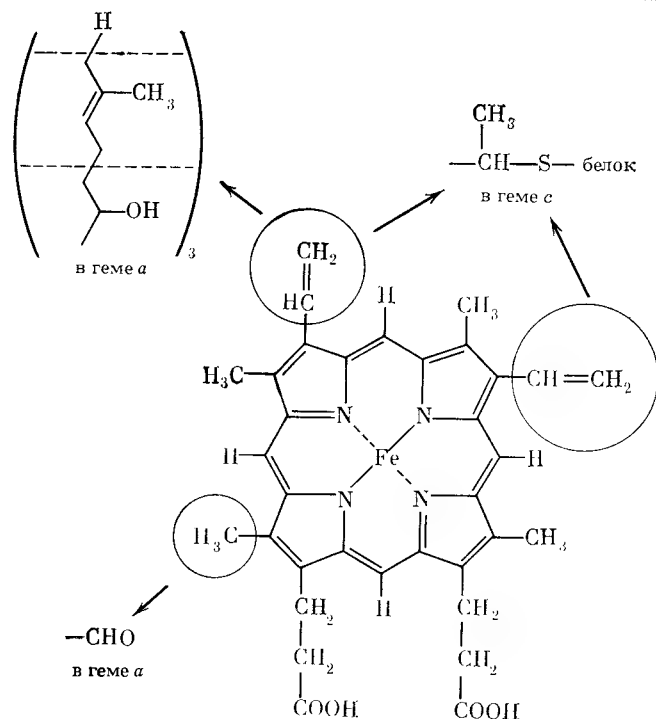


Рис. 21. Протогем, или гем b , — производное железопорфирина, входящее в состав цитохромов b

Тот же гем содержится в гемо- и миоглобинах. Гемы a и c , найденные соответственно в цитохромах групп a и c , отличаются от цитохрома b заместителями при широльных кольцах (указаны на рис.)

Гем b_1 передает электрон предварительно окисленному гему b_h (реакция 12). Цикл завершается диффузией образованного CoQ к верхней поверхности мембраны (волнистая стрелка 13).

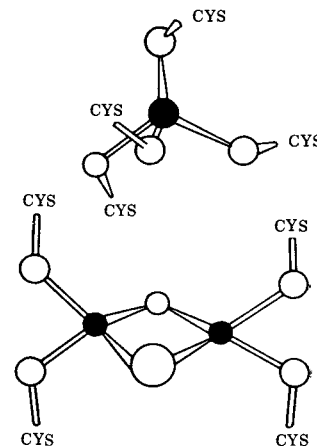
Общий итогом процесса оказывается генерация ДН вследствие переноса через мембрану двух ионов H^+ на каждый поглощенный фотон.

Энергетика цикла оплачивается фотонами, поглощенными бактериохлорофиллом. Последний, перейдя в возбужденное состояние под действием света, резко изменяет свой редокс-потенциал, который становится около -950 мВ вместо 440 мВ в невозбужденном состоянии. Все дальнейшие реакции переноса электронов протекают с выделением энергии, будучи направленными в сторону положительных редокс-потенциалов (рис. 24).

Белки, катализирующие циклический перенос электронов, удается разделить на два комплекса, составленные из нескольких полипептидов, а именно на комплекс реакционных центров и bc_1 -комплекс (см. обзоры: [72, 389, 1169, 1379]).

Рис. 22. Три примера железосерных кластеров негемовых FeS-протеидов

Кластер, содержащий один атом Fe (1), был описан в рубредоксине из *Clostridium pasteurianum*. Однако, как правило, атомов железа больше — два или четыре. Такие FeS-протеиды найдены у многих бактерий, митохондрий и хлоропластов. В рубредоксине все атомы серы (2) принадлежат остаткам цистеина белка. В «двужелезных» системах в образовании комплекса наряду с четырьмя цистеинами участвуют еще две серы в форме сульфида (S^{2-}). В кластерах с четырьмя атомами Fe количества S^{2-} и цистеинов равны четырем



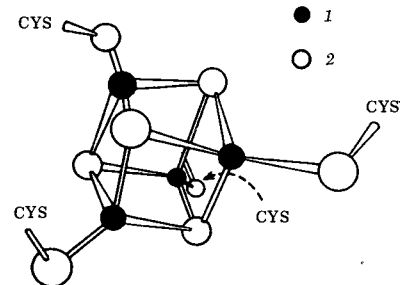
3.1.2. Комплекс реакционных центров

3.1.2.1. Белковый состав

Комплекс реакционных центров из *Rh. rubrum* состоит из трех белковых субъединиц: тяжелой (H), средней (M) и легкой (L), набранных в стехиометрии 1 : 1 : 1 [1436]. H-субъединицу удается отделить от комплекса без потери последним способности к светозависимому переносу электронов [550, 1592]. Обработка протеиназой удаляет также и небольшую часть M-субъединицы. Получающийся при этом комплекс, содержащий интактную L-субъединицу и большую часть M-субъединицы, все еще может окислять цитохром c_2 под действием света [1592].

Комплекс реакционных центров *Rps. viridis* содержит кроме H-, M- и L-субъединиц еще и прочно связанный цитохром с четырьмя гемами s -типа. Молекулярные массы этого цитохрома, H-, M- и L-субъединиц, полученные посредством электрофореза в додецилсульфате натрия, оказались равными соответственно 38, 35, 28 и 24 кДа [1505]. Однако определение первичной структуры, сделанное впоследствии Дайзенхофером и соавт. [454, 1026], дало величины 40,5, 28,3, 35,9 и 30,6 кДа (336, 258, 323 и 273 аминокислотных остатка) (рис. 25).

Определение аминокислотной последовательности M-субъединицы из бактерии того же рода, но другого вида, а именно *Rps. sphaeroides* [1600], показало, что ее молекулярная масса равна 34 кДа (307 аминокислот) вместо величины 24 кДа, полученной при электрофорезе [1437].



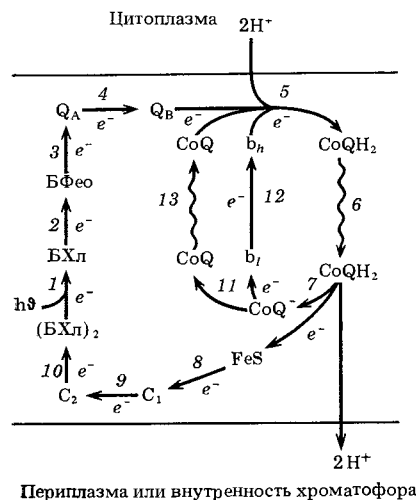
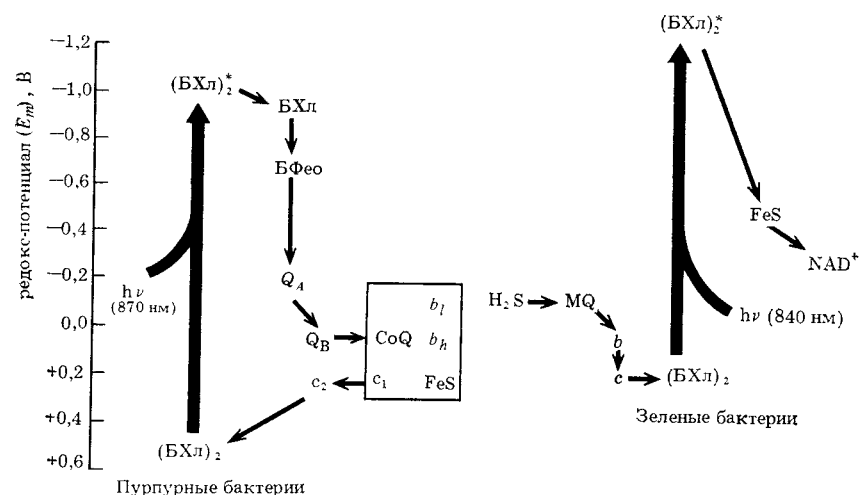


Рис. 23. Циклическая редокс-цепь пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rh. rubrum*

БХл — бактериохлорофилл; БФео — бактериофеофитин; Q_A и Q_B — две молекулы убихинона, связанного с белками реакционных центров; b_h и b_l — высоко- и низкпотенциальные гемы цитохрома b ; FeS — негемовый железосеропротеид; c_1 и c_2 — соответствующие цитохромы

Рис. 24. Средноточечные редокс-потенциалы переносчиков электронов в фотосинтетических системах пурпурных и зеленых бактерий (по: Матсуура и Даттон [1002])



Построение профиля гидрофобности аминокислотной последовательности М-субъединицы свидетельствует о том, что белок содержит пять гидрофобных сегментов, составленных по крайней мере из 20 аминокислот. Каждый из сегментов обладает достаточной длиной, чтобы пересечь мембрану, будучи уложенным в α -спираль.

Методами кругового дихроизма и поляризационной инфракрасной спектроскопии были получены свидетельства того, что белки реакционных центров содержат высокий процент α -спи-

ральных структур, ориентированных примерно поперек мембраны [1085].

Это заключение недавно было прямо подтверждено данными рентгеноструктурного анализа комплекса реакционных центров из *Rps. viridis*. Работа была выполнена Михелем и его коллегами [453—455]. Авторам удалось получить кристаллы диаметром 0,5—1 мм путем высаливания комплексов сульфатом аммония из раствора, содержащего 1% амфифильного соединения — гептан-1,2,3-триола и 0,1% детергента — N-окиси-N,N-диметилдодециламина [453, 1023]. Полученные кристаллы были фотохимически активны, не наблюдалось каких-либо смещений максимумов поглощения хромофоров, хотя соотношение этих максимумов было несколько изменено [453, 860].

Рентгеноструктурное исследование кристаллов позволило впервые увидеть трехмерную структуру мембранного преобразователя энергии с разрешением 0,3 нм. Было найдено, что комплекс длиной 13 нм состоит из двух периферических доменов (один из которых — четырехгемовый цитохром c , а другой — Н-субъединица) и центральной части, образованной главным образом М- и L-субъединицами. Именно эти группы несут бактериохлорофиллы b -типа, феофитины b -типа, хиноны и негемовое железо. Сопоставление рентгеноструктурных данных с результатами, полученными ранее другими методами, позволяет утверждать, что цитохром c локализован на периплазматической стороне мембраны, Н-субъединица — в основном на цитоплазматической ее стороне, а М- и L-субъединицы интегрированы в гидрофобный слой мембраны.

На рентгеноструктурном изображении комплекса реакционных центров удастся выявить одиннадцать α -спиральных колонн, направленных параллельно длинной оси комплекса и локализованных в средней (предположительно мембранной) его части. Н-субъединица имеет только одну α -спиральную колонну, в то время как М- и L-субъединицы, подобные по аминокислотным последовательностям и пространственным структурам, содержат по пять таких колонн, расположенных симметрично относительно продольной оси комплекса (рис. 26).

Единственная гидрофобная α -спираль Н-субъединицы служит якорем, прикрепляющим этот гидрофильный полипептид к мембране. Что касается другой периферической субъединицы — цитохрома c , то она удерживается на мембране взаимодействием с другими субъединицами, а также двумя жирными ацилами, ковалентно связанными с глицерином, образующим тиоэфирную связь с SH-группой N-концевого цистеина этого цитохрома [1588].

При рассмотрении упаковки полипептидных цепей субъединиц Н, М и L в мембране бросается в глаза полное отсутствие заряженных аминокислот в трансмембранных α -спиральных столбах. Такие аминокислоты сосредоточены на поверхностях мемб-

R. vir. L TVCALGAFISWMLREVEISRKLIGWHVPLAF¹⁶¹CVPIFMFCVLQVFRPLLLGSWGHAF¹⁴⁴PPYG
R. sph. L TICATGAFVSWALREVEICRKLIGYHIPFAFAAILAYLTLVLF¹⁶¹RPVMMGAWGYAF¹⁴⁴PPYG
R. caps. L TVCATGAFCSWALREVEICRKLIGIGHIPVAFSMAIFAYLTLV¹⁶¹IRPMMMGWGYAF¹⁴⁴PPYG
R. vir. M GLFMTLSLGSW¹⁶¹IRVYSRARGLG¹⁶¹THIAWNFAAAFFVLCIGC¹⁶¹IHPTLVGSWSEGV¹⁶¹PPG
R. sph. M SFFMFVAVWSWGR¹⁶¹TYLRAQALGMGKHTAWAFLSAIWLWMVLG¹⁶¹FI¹⁶¹RPILMGWSEAV¹⁶¹PPG
R. caps. M SLFMAISVIAWVVRVYTRADQLGMGKHM¹⁶¹AWAFLSAIWLWSVLGFW¹⁶¹RPILMGSWSVAP¹⁶¹PPG
R. vir. L ILSHLDWVNNFGYQY¹⁶¹LNWHYNPGH¹⁶¹SSVSFLFVNAMALGLHG¹⁶¹LILSVANPGD¹⁶¹-----
R. sph. L I¹⁶¹WTHLDWVSNTGYTYGNFHNPAH¹⁶¹MI¹⁶¹AISFFFTNALALHGA¹⁶¹LVLSAANPEK¹⁶¹-----
R. caps. L I¹⁶¹WTHLDWVSNTGYTYGNFHNPFH¹⁶¹MLGISLFTTAWALAMHGA¹⁶¹LVLSAANPVK¹⁶¹-----
R. vir. M I¹⁶¹WPHIDWLTA¹⁶¹FSIRYGNFY¹⁶¹CPWHGFSIGFAYGCGLLFAAHGATILAVARFGDREIEQI¹⁶¹
R. sph. M I¹⁶¹FSHLDWTN¹⁶¹NFSLVHG¹⁶¹NLFYNPFHGLSIAFLYGSALLFAMHGATILAVSRFGGEREIEQI¹⁶¹
R. caps. M I¹⁶¹FSHLDWTN¹⁶¹QFSLDHG¹⁶¹NLFYNPFHGLSIAAALYGSALLFAMHGATILAVTRPGGERELE¹⁶¹EOI¹⁶¹
R. vir. L -DKVKTAEHENQYFRDVVGYSIGALS²²¹I²²¹HRGLGLFLASNIFLTGA²⁶¹FGT²⁶¹IASGPFWTRGWPEW²⁶¹
R. sph. L -KEMRTPDHEDTFFRDLVGYSIGTLGIHRLGLLLSLSAVFFSALCMIITGTIWF²⁶¹DQWVDW²⁶¹
R. caps. L -KTMRTPDHEDTYFRDLMGYSVGTGLGIHRLGLLLALNAVFSACCMLVSGTIYFDLWSDW²⁶¹
R. vir. M TDRGTAVERAALFWRTIGFNATIESVHRWGWF²⁶¹FSLMVMVSASVGILLTGTFV-DNWYLVW²⁶¹
R. sph. M ADRGTA²⁶¹AERAALFWRTMGFNATMEGIHRWAIWMAVLVTLTGGIGILLSGTVV-DNWYVW²⁶¹
R. caps. M VDRGTASERAALFWRTMGFNATMEGIHRWAIWMAVMVTLTGGIGILLSGTVV-DNWYVW²⁶¹
R. vir. L WGW²⁴¹WLDIPFWS*
R. sph. L WQWVVKLPWWANIPGGING*
R. caps. L WYWWVNMPFWADMAGGING*
R. vir. M CVKHGAAPDYPAYLPATPD³⁰¹PASLPGAPK*
R. sph. M GQNHGMAPLN*
R. caps. M AQVHGYAPVTP*

6

Met	Tyr	His	Gly	Ala	Leu	Ala	Gln	His	Leu
<u>ATG</u>	<u>TAT</u>	<u>CAC</u>	<u>GGC</u>	<u>GCT</u>	<u>CTC</u>	<u>GCT</u>	<u>CAA</u>	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>
Trp	Leu	Val	Ile	Trp	Thr	Val	Val	Leu	Leu
<u>TGG</u>	<u>CTG</u>	<u>GTC</u>	<u>ATC</u>	<u>TGG</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>GTC</u>	<u>CTG</u>	<u>CTG</u>
Tyr	Pro	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Gly	Leu	Val
<u>TAC</u>	<u>CCG</u>	<u>CTG</u>	<u>GTC</u>	<u>GAG</u>	<u>CCG</u>	<u>CTT</u>	<u>GGT</u>	<u>CTC</u>	<u>GTC</u>
<i>TaqI</i>									
Glu	Leu	Pro	Tyr	Pro	Lys	Thr	Phe	Val	Leu
<u>GAG</u>	<u>CTG</u>	<u>CCC</u>	<u>TAT</u>	<u>CCC</u>	<u>AAG</u>	<u>ACG</u>	<u>TTC</u>	<u>GTG</u>	<u>CTC</u>
Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Leu	Lys	Leu
<u>CGT</u>	<u>CGT</u>	<u>CCG</u>	<u>GAA</u>	<u>ACC</u>	<u>CGC</u>	<u>GAA</u>	<u>CTG</u>	<u>AAG</u>	<u>CTG</u>
Leu	Gln	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Val	Asp
<u>CTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CCG</u>	<u>ACC</u>	<u>GGC</u>	<u>AAT</u>	<u>CCG</u>	<u>CTG</u>	<u>GTC</u>	<u>GAC</u>
<i>PstI</i>									
Ala	Glu	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Val	Asp	Gly
<u>GCG</u>	<u>GAA</u>	<u>GTG</u>	<u>GTC</u>	<u>GAC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>GAC</u>	<u>GGC</u>
Thr	Asp	Phe	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Asp	Val
<u>ACC</u>	<u>GAC</u>	<u>TTC</u>	<u>TCG</u>	<u>ATC</u>	<u>GCG</u>	<u>GAA</u>	<u>GGC</u>	<u>GAC</u>	<u>GTC</u>
Asp	Gly	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Asp
<u>GAC</u>	<u>GGC</u>	<u>GTC</u>	<u>GAG</u>	<u>GCT</u>	<u>GGT</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>ACC</u>	<u>GAC</u>
Arg	Tyr	Leu	Glu	Leu	Ser	Val	Ala	Gly	Ser
<u>CGC</u>	<u>TAC</u>	<u>CTC</u>	<u>GAG</u>	<u>CTC</u>	<u>TCG</u>	<u>GTG</u>	<u>GCC</u>	<u>GGC</u>	<u>AGC</u>
<i>XhoI</i>									
Cys	Asp	Val	Lys	Lys	Asp	Lys	Ile	Val	Val
<u>TGC</u>	<u>GAC</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>AAG</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	<u>ATC</u>	<u>GTC</u>	<u>GTG</u>
Val	Pro	Arg	Leu	Gln	Ser	Arg	Asp	Gln	Ile
<u>GTG</u>	<u>CCG</u>	<u>CGT</u>	<u>CTG</u>	<u>CAG</u>	<u>AGC</u>	<u>CGC</u>	<u>GAC</u>	<u>CAG</u>	<u>ATC</u>
<i>PstI</i>									
Tyr	Tyr	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Tyr	Ala	Thr
<u>TAC</u>	<u>TAC</u>	<u>GCT</u>	<u>GGC</u>	<u>GGT</u>	<u>CTG</u>	<u>CTC</u>	<u>TAC</u>	<u>GCG</u>	<u>ACG</u>

ACGACGATTTCGA
TaqI

6

Shine-Dalgarno

G AATTC CCGG CTAGACAGTT TTCTGCCAC GGAGGTTCTT

EcoRI

Asp	Ile	Ala	Gln	Leu	Val	Trp	Tyr	Ala	Gln
<u>GAC</u>	<u>ATC</u>	<u>GCA</u>	<u>CAA</u>	<u>CTC</u>	<u>GTA</u>	<u>TGG</u>	<u>TAC</u>	<u>GCG</u>	<u>CAG</u>
Tyr	Leu	Arg	Arg	Glu	Asp	Arg	Arg	Glu	Gly
<u>TAC</u>	<u>CTC</u>	<u>CGC</u>	<u>CGT</u>	<u>GAG</u>	<u>GAC</u>	<u>CGT</u>	<u>CGC</u>	<u>GAA</u>	<u>GGC</u>
Lys	Leu	Ala	Pro	Glu	Asp	Gly	Gln	Val	Tyr
<u>AAG</u>	<u>CTG</u>	<u>GCG</u>	<u>CCG</u>	<u>GAA</u>	<u>GAC</u>	<u>GGC</u>	<u>CAG</u>	<u>GTC</u>	<u>TAC</u>
Pro	His	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Arg
<u>CCG</u>	<u>CAC</u>	<u>GGC</u>	<u>GGC</u>	<u>ACC</u>	<u>GTC</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>CCG</u>	<u>CGT</u>
Ala	Gln	Thr	Asp	Gly	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro
<u>GCG</u>	<u>CAG</u>	<u>ACC</u>	<u>GAC</u>	<u>GGC</u>	<u>TTC</u>	<u>GAA</u>	<u>GGC</u>	<u>GCC</u>	<u>CCG</u>
<i>TaqI</i>									
Ala	Val	Gly	Pro	Ala	Ser	Tyr	Ala	Glu	Arg
<u>GCC</u>	<u>GTC</u>	<u>GGC</u>	<u>CCG</u>	<u>GCT</u>	<u>TCG</u>	<u>TAT</u>	<u>GCC</u>	<u>GAG</u>	<u>CGT</u>
Lys	Ala	Lys	Ile	Val	Pro	Leu	Arg	Val	Ala
<u>AAG</u>	<u>GCC</u>	<u>AAG</u>	<u>ATC</u>	<u>GTC</u>	<u>CCG</u>	<u>CTG</u>	<u>CGC</u>	<u>GTT</u>	<u>GCG</u>
Asp	Pro	Arg	Gly	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Ala
<u>GAT</u>	<u>CCG</u>	<u>CGT</u>	<u>GGC</u>	<u>CTG</u>	<u>CCG</u>	<u>GTG</u>	<u>GTT</u>	<u>GCC</u>	<u>GCT</u>
Leu	Trp	Val	Asp	Arg	Ser	Glu	His	Tyr	Phe
<u>CTC</u>	<u>TGG</u>	<u>GTC</u>	<u>GAC</u>	<u>CGC</u>	<u>TCG</u>	<u>GAG</u>	<u>CAC</u>	<u>TAT</u>	<u>TTC</u>
Ala	Arg	Thr	Ala	Leu	Ile	Pro	Leu	Gly	Phe
<u>GCC</u>	<u>CGC</u>	<u>ACC</u>	<u>GCG</u>	<u>CTG</u>	<u>ATC</u>	<u>CCG</u>	<u>CTC</u>	<u>GGC</u>	<u>TTC</u>
Thr	Ser	Ile	Leu	Ser	Glu	Gln	Phe	Ala	Asn
<u>ACG</u>	<u>TCG</u>	<u>ATC</u>	<u>CTG</u>	<u>TCC</u>	<u>GAG</u>	<u>CAG</u>	<u>TTC</u>	<u>GCC</u>	<u>AAC</u>
Thr	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Lys	Val	Ser	Ala
<u>ACG</u>	<u>CTG</u>	<u>CGC</u>	<u>GAA</u>	<u>GAA</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	<u>GTG</u>	<u>TCG</u>	<u>GCC</u>
Pro	Glu	Arg	Ala	Glu	Ser	Leu	Leu	***	
<u>CCG</u>	<u>GAG</u>	<u>CGT</u>	<u>GCG</u>	<u>GAA</u>	<u>TCG</u>	<u>TTG</u>	<u>CTG</u>	<u>TGA</u>	

Shine-Dalgarno
M
-20

Два мономера БХЛ закреплены несколько ниже димера под углом $\sim 70^\circ$ к последнему. Расстояние между ионами Mg^{2+} в $(BXL)_2$ и БХЛ равно 1,3 нм. Лигандами Mg^{2+} в БХЛ служат имидазолы гистидинов, входящих в состав связок между колоннами c_M и d_M , c_L и d_L (рис. 28).

На полпути между MQ и местом связывания CoQ находится атом негемового железа. Он связан с белком иначе, чем в FeS-протеидах. Четыре лиганда железа были идентифицированы как имидазольные группы гистидиновых остатков колонн d_M, e_M, d_L и e_L. Железо прямо не контактирует с хинонами, но один из гистидинов, упомянутых выше, располагается рядом с местом для CoQ. Наименьшее расстояние между хиноном и железом равно 0,7 нм [453, 454].

Согласно данным, полученным оптическими методами, (БХЛ)₂ закреплен перпендикулярно к плоскости цитоплазматической мембраны *Rps. viridis* [1136, 1159]. Вот почему представляется весьма вероятным, что длинная ось комплекса реакционного центра расположена поперек мембраны. Расстояние между ато-

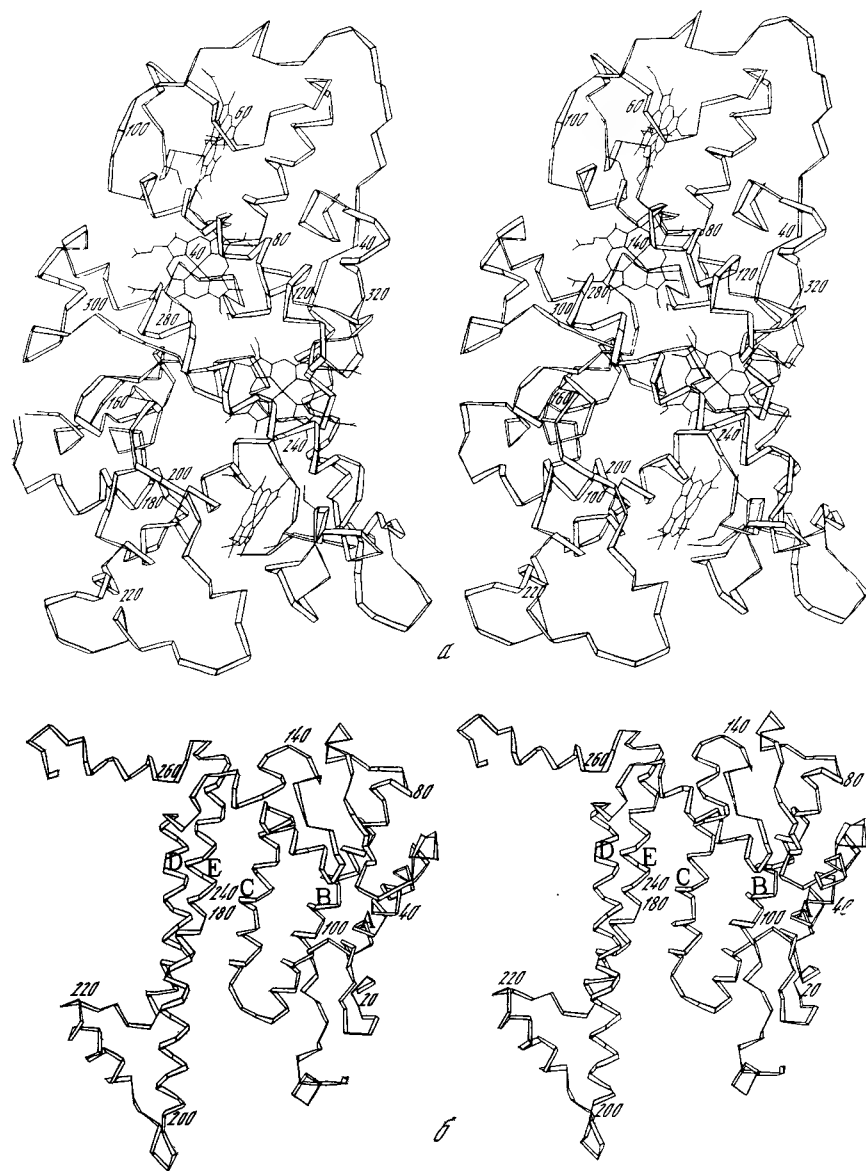
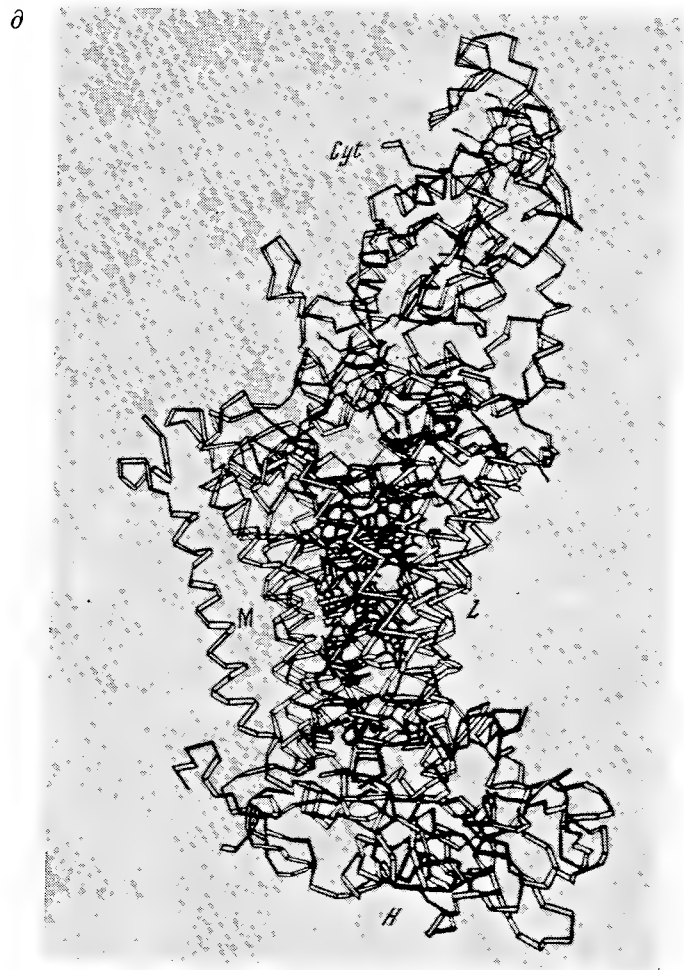


Рис. 26. Структура белковых субъединиц реакционного центра *Rps. viridis*
 а, б, в и г — цитохром с, L-, M- и Н-субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа (стереопары), пять трансмембранных α -спиральных колонн субъединиц М и L обозначены буквами А — Е; д — общий вид комплекса реакционного центра. Сут — цитохром с, L, М и Н — соответствующие субъединицы; е — схема, иллюстрирующая расположение α -спиральных колонн (вид сверху). Заштрихована область, где расположены хромофоры



Колонны не совсем перпендикулярны по отношению к плоскости мембраны. Для колонны D отклонение 38° , для других колонны $<25^\circ$. При этом колонны сближаются у цитоплазматической стороны мембраны и расходятся вблизи периплазматической ее стороны. Дан срез, прошедший предположительно через середину гидрофобного слоя мембраны (по: Дайзенхофер и соавт. [454]. Схема е взята из обзора Хендерсона [707])]



мами Mg в (БХл)₂ и MQ равно приблизительно 3,0 нм, так что электрон, перенесенный от (БХл)₂ к MQ, должен пересечь большую часть гидрофобного барьера мембраны.

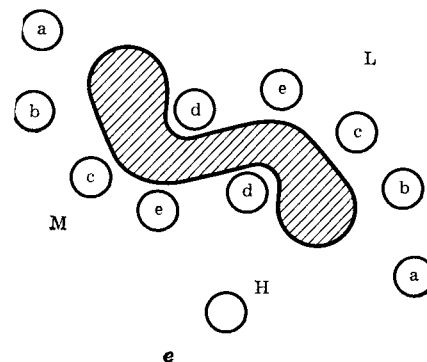
В целом система, составленная из бактериохлорофиллов, бактериофеофитинов и хинонов, выглядит как два параллельных пути переноса электронов. Можно было бы предположить, что один электрон, восстанавливающий CoQ до CoQ⁻, транспортируется правой ветвью, т. е. через MQ, а другой электрон, необходимый для восстановления CoQ⁻, поставляется левой ветвью, т. е. без участия MQ. Однако опыты показали, что один из путей (предположительно левый) не участвует в переносе электронов на CoQ [517, 991, 1169, 1258].

Рис. 26 (окончание)

Этот очевидный парадокс можно, по нашему мнению, объяснить следующим образом.

Перенос электронов в фотосинтетической редокс-цепи современных бактерий должен быть организован так, чтобы при постоянном освещении один из двух электронов, восстанавливающих свободный Q, поставлялся реакционным центром, а другой электрон — цитохромом *b_h* (см. рис. 23). Если это условие выполняется, то *один* фотон оказывается способным вызвать перенос *двух* ионов H⁺. Быть может, дисфункция левой ветви переноса электронов повысила шансы цитохрома *b_h* в конкуренции с реакционным центром за окисленный CoQ. Впоследствии, по-видимому, появился какой-то механизм, позволяющий обойтись без стадии диффузии нестабильного CoQ⁻ между реакционным центром и цитохромом *b_h*. Однако к этому времени левая ветвь была уже необратимо повреждена. В рамках такого предположения левые БХл и БФео на рис. 27 выглядят как рудименты, оставшиеся от тех времен, когда цитохром *b* не участвовал в фотосинтетической редокс-цепи и эффективность этой примитивной цепи была вдвое ниже, чем теперь (H⁺: $h\nu = 1$ вместо 2). Исключение двух бездействующих пигментов из комплекса реакционных центров могло оказаться невозможным без неблагоприятных изменений в структуре комплекса. Такого рода эффекты представляются вполне вероятными, если учесть, что комплекс осуществляет самый быстрый из процессов, известных в биологии, и любое изменение его структуры могло бы повлечь за собой нежелательные последствия. Судя по данным рентгеноструктурного анализа, хромофорные группы должны стабилизировать пространственную организацию комплекса.

Заканчивая этот раздел, мы хотели бы отметить, что данные рентгеноструктурного анализа фактически подтвердили схему расположения хромофоров, постулированную В. А. Шуваловым и А. А. Асадовым в 1979 г. на основании измерений линейного и кругового дихроизма реакционных центров *Rps. viridis* и некоторых других оптических наблюдений [1376]. Они также согласуются с многими более поздними результатами, полученными посредством ряда косвенных методов (см.: [304, 453] и следующий раздел).



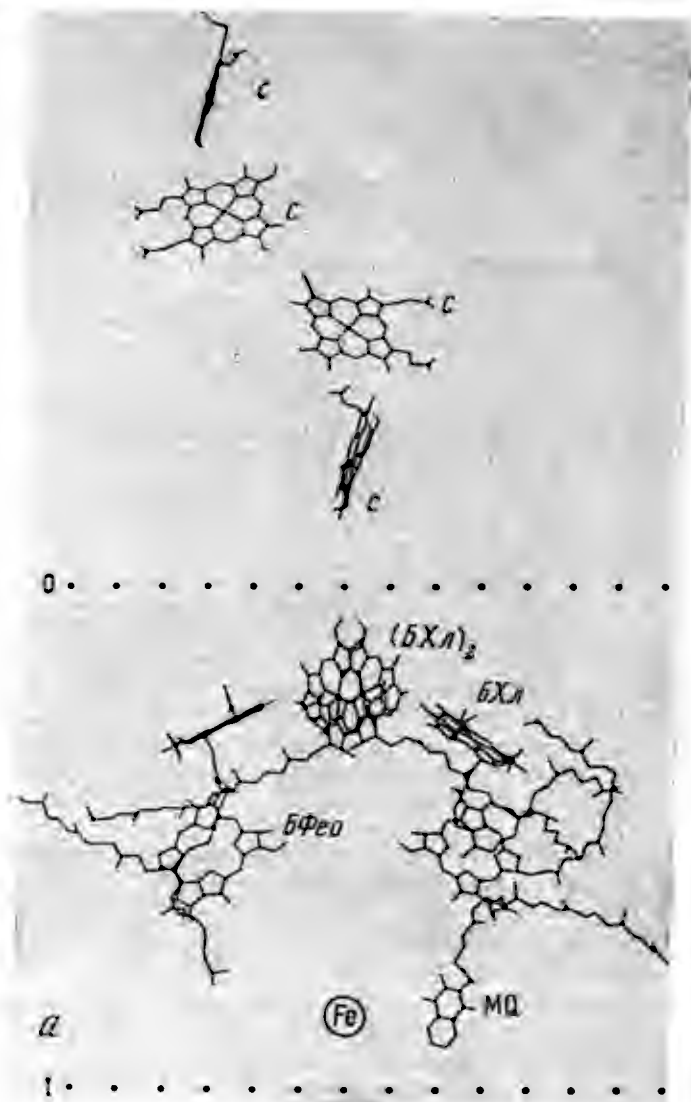
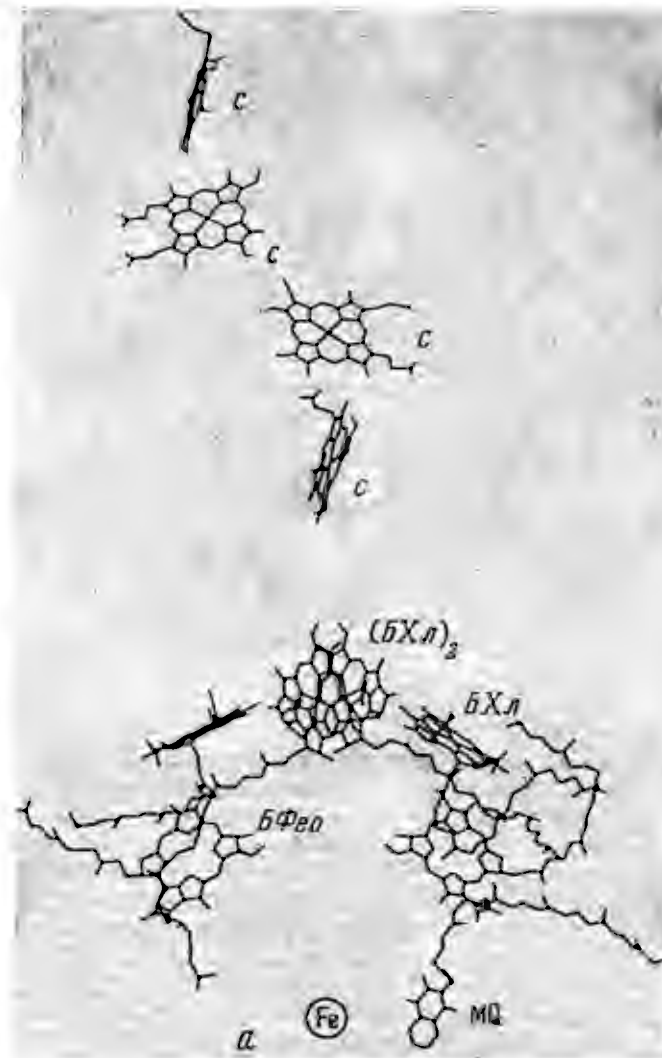


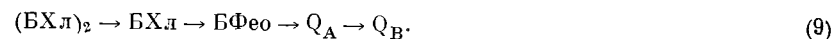
Рис. 27. Стереоскопическое изображение протетических групп в комплексе реакционных центров из *Rps. viridis* по данным рентгеноструктурного анализа

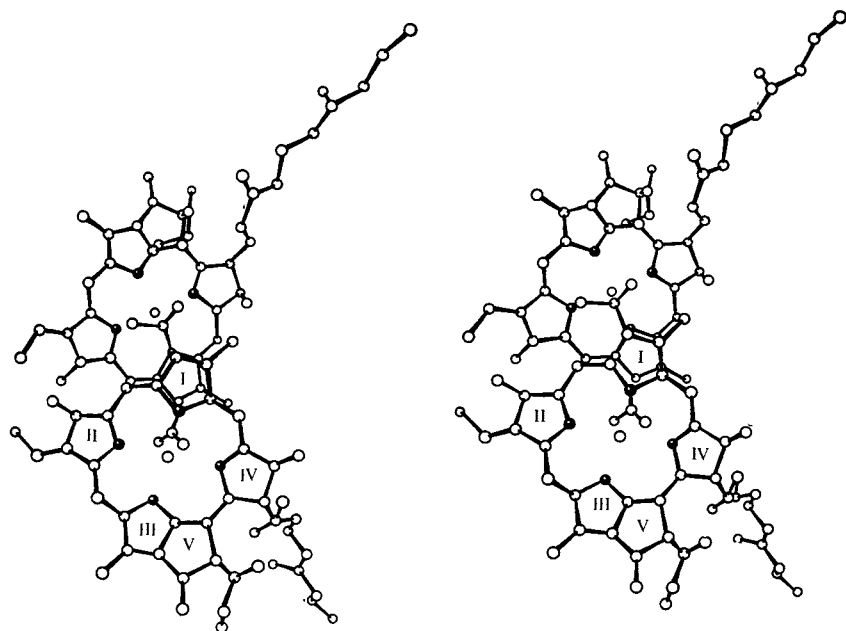
a — вид сбоку на комплекс. Пунктирные линии 0 и I обозначают соответственно предполагаемую внешнюю (периплазматическую) и внутреннюю (цитоплазматическую) поверхности мембраны *Rps. viridis*. Видны четыре гема (с), $(\text{BXL})_2$ и два мономера БХЛ, два БФео, MQ и негемовое железо (Fe) комплекса реакционных центров; б — $(\text{BXL})_2$. В одной из двух молекул БХЛ пронумерованы кольца порфириновой системы (по: Дайзенхофер и соавт. [453])



3.1.2.3. Последовательность реакций переноса электронов

После выяснения пространственного расположения редокс-групп в комплексе реакционных центров можно считать доказанным следующую цепь реакций переноса электронов, включенных между БХЛ и СоQ:

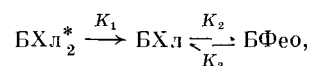




б

Рис. 27. (окончание)

Именно такая последовательность событий была постулирована на основании данных по спектральным изменениям бактериохлорофиллов и БФео в ответ на пикосекундную вспышку лазера. Пример подобного опыта приведен на рис. 29. Видно, что вызванное вспышкой окисление $(\text{БХл})_2$ сопровождается восстановлением БХл и БФео. Все эти процессы завершаются в течение 20 пс [1375, 1378]. Сплошные кривые на рис. 29 показывают кинетики переноса электрона, рассчитанные по следующей схеме:



где $1/K_1 = 3$ пс и $1/K_2 = 1/K_3 = 0,3$ пс.

Следующий этап — восстановление MQ посредством БФео⁻ — происходит с $t_{1/2}$ около 230 пс, а $t_{1/2}$ восстановления $(\text{БХл})_2^+$ до $(\text{БХл})_2$ в случае Rps. viridis оказывается порядка 270 нс [734] (на рис. 29 не показано).

Изучение реакционных центров Rps. viridis, проведенное в нашей группе, показало, что донором электронов для восстановления $(\text{БХл})_2^+$ служит один из гемов четырехгемового цитохрома c, характеризующийся α-максимумом поглощения при 559 нм и ре-

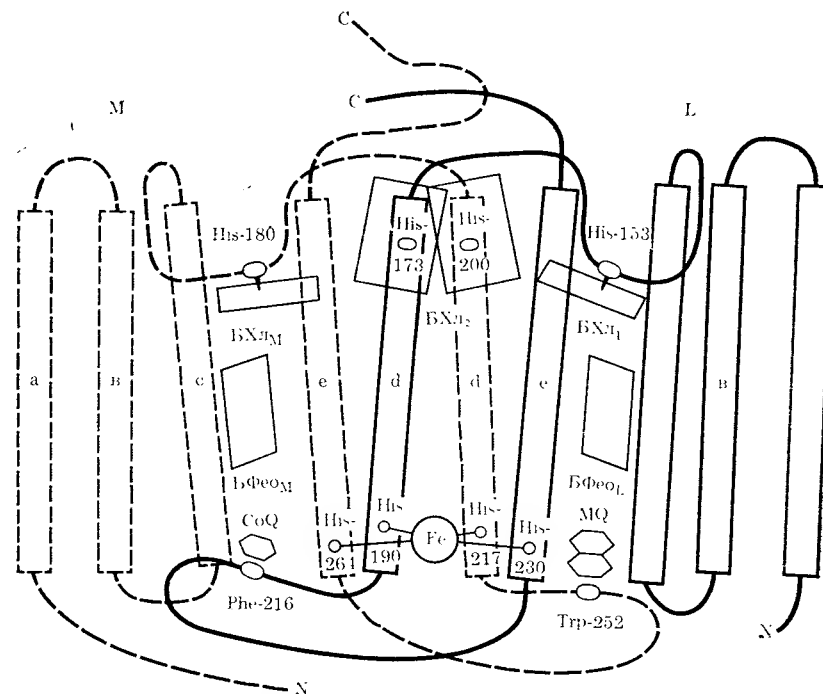


Рис. 28. Соотношение полипептидных и хромофорных компонентов реакционного центра Rps. viridis

Субъединицы L и M обозначены соответственно сплошной и прерывистой линиями (схематическое изображение, предложенное В. А. Шуваловым по материалам Дайзенхера и соавт. [454])

докс-потенциалом +380 мВ. Можно думать, что именно этот гем располагается непосредственно над $(\text{БХл})_2$ в комплексе реакционных центров. Гем₅₅₉, в свою очередь, получает электрон от другого гема (поглощение при 556 нм, редокс-потенциал +310 мВ), а тот — от водорастворимого цитохрома c_2 [504]. Роль еще двух гемов цитохрома c (редокс-потенциалы +30 мВ и -50 мВ) остается неясной. Михель и его коллеги [453] предполагают, что эти гемы участвуют в окислении H_2S до S.

Чрезвычайно высокая скорость первичных процессов фотосинтетического переноса электронов заслуживает специального обсуждения. Как уже отмечалось, названные процессы представляют собой самые быстрые химические реакции среди всех известных в биологии. По-видимому, благодаря столь высоким скоростям удается предотвратить окисление возбужденного БХл кислородом [285]. Редокс-потенциалы этих двух компонентов столь сильно отличаются, что их взаимодействие представляется термодинамически очень выгодным. По крайней мере три механизма исполь-

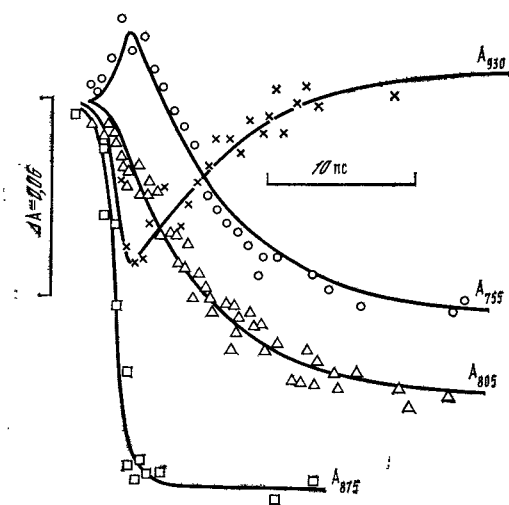


Рис. 29. Быстрая кинетика изменений поглощения света (ΔA) модифицированными комплексами реакционных центров Rps. sphaeroides без одной из двух молекул мономера бактериохлорофилла (БХЛ_М). Снижение A_{830} — переход БХЛ₂ в возбужденное состояние. Снижение A_{875} — образование (БХЛ)₂⁺. Снижение A_{815} — восстановление (БХЛ)₁. Снижение A_{755} — восстановление БФео. Возбуждение достигалось вспышкой лазера ($t_{1/2} = 0,2$ пс). Начальное возрастание поглощения при 755 нм обусловлено переходом (БХЛ)₂ в (БХЛ)₂^{*} (по: Матвеев и соавт. [89])

зуются для того, чтобы предотвратить атаку возбужденного БХЛ кислородом.

1. Первичный донор электронов, т. е. (БХЛ)₂^{*}, и промежуточные акцепторы (БХЛ, БФео и хиноны) расположены очень близко друг к другу, так что могут быть достигнуты максимальные скорости переноса электронов.

2. Это обстоятельство позволяет использовать в фотосинтезе короткоживущее синглетное состояние возбужденного хлорофилла, а не долгоживущее триплетное, сократив тем самым до минимума время жизни весьма реакционноспособного БХЛ^{*} и, следовательно, вероятность его взаимодействия с кислородом.

3. В фотосинтетической мембране имеется большое количество антиоксидантов. Таковы прежде всего каротиноиды, а также СоQ и MQ с их длинными изопrenoидными остатками. Антиоксидантные свойства присущи также и самому БХЛ [76a].

У Rps. viridis анион-радикал MQ⁻ — первый промежуточный продукт, чье время жизни сравнимо с таковым для интермедиатов большинства ферментативных процессов. Окисление MQ⁻ связанным СоQ занимает порядка 0,1 мс. Поэтому MQ часто называют первичным акцептором электронов. В некоторых бактериях эту роль играет не MQ, а СоQ. В таких случаях каждый комплекс реакционных центров содержит две молекулы СоQ: первичный акцептор СоQ_A и вторичный акцептор СоQ_B.

Перенос электронов на уровне хинонов как-то связан с присутствием негемового железа [526]. При этом оно не претерпевает окисления и восстановления, все время находясь в форме Fe²⁺. Показано, что Mn²⁺ вполне успешно заменяет Fe²⁺ [1136].

Одна из точек зрения на механизм переноса электронов комплексом реакционных центров состояла в том, что СоQ_B⁻ служит конечным продуктом процесса, катализируемого комплексом:



Другая, более вероятная, возможность сводится к тому, что не только Q_B, но и Q_B⁻ восстанавливается посредством O_A⁻ (уравнение 11). В пользу этого варианта указывает тот факт, что Q_B⁻ в отличие от Q_B и Q_BH₂ очень прочно связан с L-субъединицей комплекса реакционных центров.

Двухэлектронное восстановление СоQ_B сопровождается присоединением двух протонов:



3.1.2.4. Механизм генерации ΔFН

Существует целый ряд свидетельств тому, что цитохром c₂ и хинон локализованы на противоположных сторонах мембраны (см. обзоры: [412, 453, 1136]). В частности, важное наблюдение было сделано Блазье и соавт. [265]. Как показали опыты с использованием синхротронного излучения, проведенные на протеолипосомах с реакционными центрами, реконструированными с добавленным цитохромом c, расстояние между атомами Fe цитохрома c и связанного с хинонами негемового железа, проецированное на профиль мембраны, равно 4,4 нм при погрешности метода менее 0,2 нм. Напомним, что, по данным Михеля и соавт. [453], расстояние между негемовым железом и хиноном составляет менее 1 нм. Сопоставив эти два факта, можно заключить, что электрон, перемещающийся по редокс-группам реакционного центра, пересекает большую часть гидрофобной сердцевины мембраны.

Твердо установлено, что цитохром c₂ локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны (в хроматофоре — на внутренней стороне). Поэтому перенос восстановительных эквивалентов через мембрану происходит в направлении ее цитоплазматической поверхности. Если от цитохрома c₂ к хинону переносится электрон, то цитоплазма должна заряжаться отрицательно относительно периплазмы или внутренности хроматофора.

Такое предположение было подтверждено целым рядом опытов, где измеряли генерацию ΔF реакционными центрами. Для этой цели применяли практически все известные тесты на ΔF, а именно электрохромный сдвиг спектра каротиноидов, распределение ионов K⁺ в присутствии валиномицина, транспорт синтетических проникающих ионов, измерение ΔF электродами в системе «хроматофоры (или протеолипосомы) — коллоидная пленка». Согласно всем этим измерениям, свет индуцирует генерацию ΔF таким образом, что положительно заряжается отсек с цитохромом c₂ (см. обзор: [1405]).

Каротиноидный сдвиг и метод коллодиевой пленки позволили измерить генерацию ΔpH в микросекундной и наносекундной временных шкалах. Оказалось, что основной вклад в генерацию ΔpH вносит процесс, скорость которого больше, чем 50 нс (разрешение измерительной аппаратуры) [63, 439, 503]. В цепи событий, происходящих в реакционных центрах, столь быстрые реакции локализованы между $(\text{БХл})_2$ и Q_A . Сопоставив это наблюдение с данными по трансмембранному расположению редокс-групп реакционных центров, можно заключить, что перенос электронов от $(\text{БХл})_2$ к Q_A имеет электрогенный характер, т. е. движение электрона поперек мембраны электрически не компенсировано перемещением какого-либо другого заряда.

Недавно Триссл и соавт. [461] измерили электрический ответ клеток *Rps. viridis* с еще большим временным разрешением, используя разработанный ими же метод светового градиента [1521]. Измерение ΔpH этим методом дает величины хотя и заниженные по крайней мере в 100 раз, но с разрешением 40 пс. Были выявлены две электрогенные фазы ($\tau_1 \leq 40$ пс и $\tau_2 = 125$ пс) примерно одинаковой амплитуды. Первая фаза соответствовала восстановлению БФео посредством $(\text{БХл})_2$, а вторая — окислению БФео⁺ посредством MQ [461].

Более медленные электрогенные стадии были обнаружены нами при исследовании протеолипосом с реакционными центрами, сорбированными на коллодиевой пленке (опыты были проведены совместно с лабораторией В. А. Шувалова). Одна из них возникала, если добавляли CoQ_{10} в декановый раствор фосфолипидов, используемый для пропитки коллодиевой пленки. Амплитуда этой стадии составляла около 10% от общей ΔpH , генерируемой на вспышку лазера. Величина $t_{1/2}$ медленной стадии была около 400 мкс, т. е. несколько медленней, чем скорость восстановления Q_B . Эффект оказался чувствительным к *o*-фенантролину, тормозящему восстановление Q_B . Было сделано заключение, что обнаруженная электрогенная стадия как-то связана с восстановлением Q_B . По-видимому, декан экстрагирует Q_B из мембраны хроматофоров или протеолипосом, прикрепленных к пропитанной этим углеводородом коллодиевой пленке, а добавление CoQ предотвращает подобный эффект [56, 70].

Возможны два различных механизма медленной электрогенной стадии:

1) Q_B локализован ближе к цитоплазматической поверхности мембраны, чем Q_A , так что перенос электронов с Q_A на Q_B имеет электрогенный характер;

2) существует H^+ -проводящий путь от поверхности мембраны к Q_B . Ионы H^+ движутся по этому пути к восстановленному Q_B и протонируют его с образованием QH_2 .

Чтобы выбрать один из вариантов, мы исследовали эффект двух последовательных лазерных вспышек длительностью 30 нс.

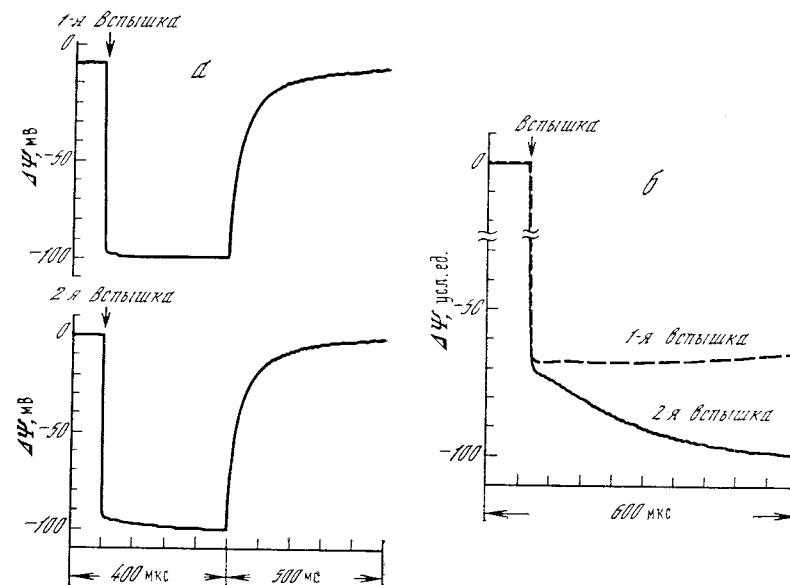


Рис. 30. Генерация ΔpH комплексами реакционных центров *Rps. viridis* в ответ на две последовательные 15-наносекундные вспышки лазера, данные с интервалом 0,5 с

Момент вспышки показан вертикальной стрелкой. Видно, что только вторая вспышка вызывает появление «медленной» (микросекундной) электрогенной стадии (а). На рис. б эта стадия показана при большем разрешении, где пунктирная и сплошная линии означают соответственно первую и вторую вспышку. CoQ_{10} был добавлен в раствор для пропитки пленки. Редокс-потенциал среды +240 мВ (по: Драчева и соавт. [503])

Если верен первый вариант, обе вспышки должны вызвать появление медленной электрогенной стадии. В альтернативном случае такая стадия будет возникать только при второй вспышке, так как CoQ^+ , образующийся в результате первого однократного срабатывания реакционного центра, не протонируется при физиологических значениях pH. Протонирование происходит после присоединения второго электрона, для чего необходима вторая вспышка.

Как показано на рис. 30, только вторая вспышка дает медленную электрогенную стадию. Это означает справедливость второго варианта, предполагающего перенос H^+ из воды к месту локализации Q_B внутри комплекса реакционных центров [503]. Допустив постоянство диэлектрических свойств гидрофобного барьера мембраны по всей ее толщине, мы можем оценить, какую часть этого барьера проходит H^+ . Поскольку медленная стадия составляет 10% от всего электрического ответа на вторую вспышку света, можно было бы принять, что протон перенос-

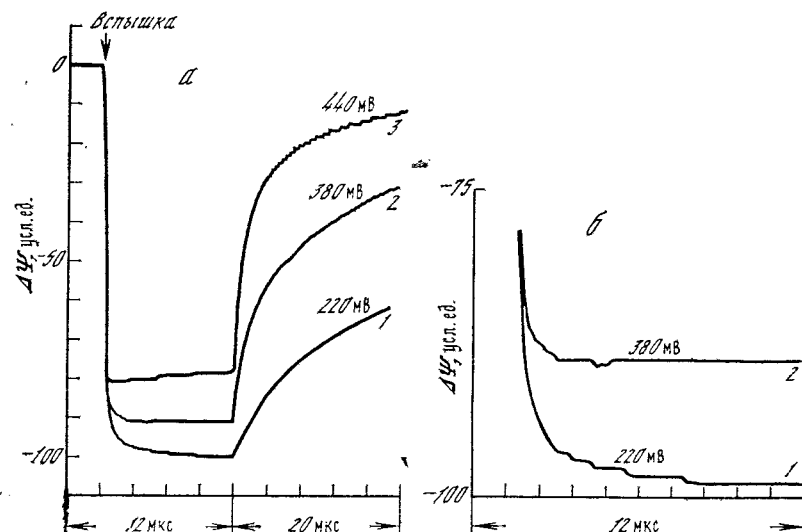


Рис. 31. Генерация $\Delta\Psi$ комплексами реакционных центров *Rps. viridis*: роль высокопотенциальных гемов цитохрома *c*

Измерение проводилось при редокс-потенциале среды (E) +220 мВ (1) (два высокопотенциальных гема тетрагемового цитохрома *c* восстановлены, а два низкопотенциальных — окислены), +380 мВ (2) (50%-ная степень восстановленности одного из высокопотенциальных гемов) и при +440 мВ (3) (все четыре гема окислены). Справа (б) дана часть рис. а более крупным планом (по: Драчева и соавт. [503])

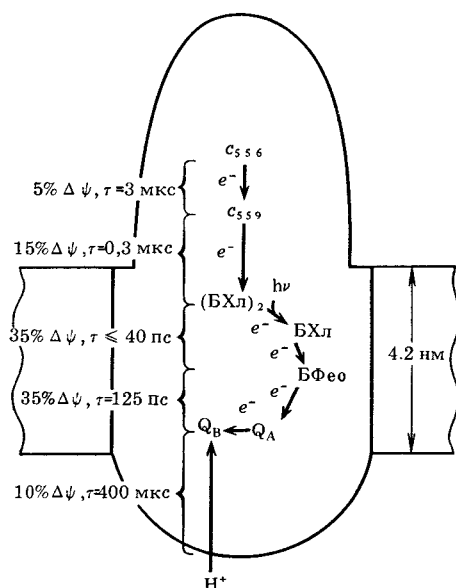


Рис. 32. Механизм и соотношение электрогенных стадий в образовании $\Delta\Psi$ комплексом реакционных центров *Rps. viridis*

Вклад каждой стадии приведен применительно к ответу на вторую вспышку света. При расчете на одну вспышку в среднем вклад переноса H^+ уменьшится с 10% до 5%, а вклады остальных стадий, связанных с переносом электрона, соответственно возрастут

сится на 1/10 часть толщины мембраны [503]. Дальнейшее исследование, однако, показало, что реальная ситуация не столь проста.

Чтобы оценить вклад цитохрома *c*, мы использовали условия, при которых два гема цитохрома *c* (а именно c_{556} и c_{559}) были восстановлены. СоQ не добавляли, чтобы избежать появления электрогенных стадий, сопровождающих протонирование CoQ^{2+} .

Было показано, что вспышка лазера, вызывающая фотоокисление $(\text{BXL})_2$, приводит к временному окислению этих гемов (полувремени около 300 нс для гема c_{559} и 3 мкс для гема c_{556}). Окисление гемов сопровождается генерацией $\Delta\Psi$, которая также носит двухфазный характер, кинетика каждой из фаз соответствует таковой окисления гемов. Вклады быстрой и медленной цитохромных электрогенных фаз в общую $\Delta\Psi$ оказались соответственно 15 и 5% (рис. 31) [503].

На рис. 32 приведена схема, иллюстрирующая структурно-функциональные характеристики реакционных центров *Rps. viridis*. Расстояния между редокс-группами соответствуют данным рентгеноструктурного анализа. Поверхности мембраны проведены достаточно условно, поскольку точных сведений по этому поводу пока нет. Вследствие этого мы не можем ответить, например, на вопрос, почему перенос H^+ от цитоплазматической стороны мембраны к СоQ дает всего лишь 10% общего $\Delta\Psi$: то ли путь протона (из воды к СоQ) короче, чем путь электрона (от цитохрома *c* к СоQ), то ли H^+ переносится через менее гидрофобную часть комплекса. Вероятнее всего, играют роль оба эти фактора. Именно такова, по-видимому, ситуация на тех этапах, где переносится электрон. Расстояние между Q_A и $(\text{BXL})_2$, $(\text{BXL})_2$ и c_{559} , c_{559} и c_{556} по оси, вертикальной к плоскости мембраны, равны соответственно 2,9, 2,1 и 1,2 нм. Если бы вклад каждой из этих стадий в общий электрогенез определялся только расстоянием между редокс-группами, то вклады относились бы друг к другу как 1:0,7:0,4. В действительности же соотношение между ними 1:0,2:0,07. Это означает, что вклад тем больше, чем глубже данный этап переноса электрона погружен в мембрану. Такая закономерность становится понятной, если учесть, что величина диэлектрической постоянной в мембране должна возрастать по мере приближения к водной фазе.

Когда Митчел в 1960-е годы формулировал свою хемиосмотическую гипотезу, он предположил, что электрон, двигаясь от цитохрома *c* к СоQ через БХЛ, пересекает гидрофобный барьер мембраны (электронтранспортная «полупетля») [1046, 1047]. Это предположение, в то время чисто умозрительное, сегодня прямо доказано. Единственный новый момент, выявленный в результате экспериментальной проверки гипотезы, состоит в том, что существует небольшая, но измеримая электрогенная стадия, обусловленная не переносом электрона, а встречным движением протона, необходимого для образования CoQH_2 из CoQ^{2+} .

3.1.3. СоQ-цитохром c -редуктаза

СоQ-цитохром c -редуктаза (комплекс bc_1) была открыта и детально изучена при исследовании дыхательной цепи митохондрий (см. ниже раздел 3.4.4). Информация относительно молекулярных свойств компонентов этого комплекса у пурпурных фотосинтезирующих бактерий более ограничена, однако все, что известно, сильно напоминает митохондриальную систему. Поэтому в данном разделе мы лишь вкратце рассмотрим структуру бактериального комплекса bc_1 , имея в виду, что более подробно речь об этом $\Delta\bar{p}H$ -генераторе пойдет ниже.

Комплекс bc_1 включает один цитохром b , содержащий два гема (низкопотенциальный b_l , другое название b_{556} — по α -максимуму спектра поглощения, и высокопотенциальный b_h , или b_{560}), один негемовый железосерный центр (FeS), один цитохром c_1 и несколько бесцветных белковых субъединиц разной молекулярной массы, не содержащих простетических групп. СоQH₂ и цитохром c_2 служат соответственно восстановителем и окислителем комплекса bc_1 . Цитохром c_2 водорастворим и подобен цитохрому c митохондрий. В реконструированных системах митохондриальный цитохром c успешно заменяет цитохром c_2 . Редокс-потенциалы компонентов комплекса можно найти на рис. 24.

СоQ-цитохром c -редуктаза представляет собой самый медленный компонент фотосинтетической редокс-цепи. Максимальная скорость его работы *in situ* обычно не превышает 10 мс [1250].

По аналогии с митохондриями можно предположить, что генерация $\Delta\bar{p}H$ этой системой отчасти обусловлена переносом электрона поперек мембраны от гема b_l к гему b_h , как это показано на рис. 23. Этот процесс направлен в сторону цитоплазматической поверхности бактериальной мембраны. Как было установлено в опытах с хроматофорами *Rps. sphaeroides* [613], электрон, перемещаясь от гема b_l к гему b_h , пересекает 35–40% толщины мембраны. Можно полагать, что остальную часть пути проходят протоны, двигаясь в противоположном электронам направлении (см. рис. 23). Окисление гема b_h происходит, по-видимому, вблизи цитоплазматической поверхности мембраны.

Остается неясным, СоQ или СоQ⁺ либо они оба служат акцепторами электронов с b_h . Если такую роль выполняет только какой-то один из этих двух компонентов, то образование полностью восстановленной формы СоQH₂ должно включать реакцию дисмутации ($2\text{СоQ}^+ + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{СоQ} + \text{СоQH}_2$). Другим источником электронов для восстановления СоQ до СоQH₂ служит комплекс реакционных центров. Для устойчивой работы системы необходимо, чтобы из каждых двух молекул СоQ, восстановленных до СоQH₂, одна образовывалась за счет переноса электронов с реакционных центров, а другая — с b_h . В любом случае ионы во-

дорода, необходимые наряду с электронами для превращения СоQ в СоQH₂, черпаются из цитоплазмы.

Образовавшись, СоQH₂ пересекает часть гидрофобного барьера мембраны, чтобы окислиться железосульфопротеидом. В результате образуются СоQ⁺, восстановленный FeS и 2H⁺. Последние переносятся через оставшуюся часть гидрофобного барьера, чтобы оказаться в периплазме или внутреннем пространстве хроматофора. В случае *Rh. rubrum* и *Rps. sphaeroides* перенос электрона с Fe на (БХл)₂ через цитохромы c_1 и c_2 завершает цикл, как это показано на рис. 23. У *Rps. viridis* два высокопотенциальных гема тетрагемового цитохрома c включены в перенос электронов от цитохрома c_2 и (БХл)₂. Что касается двух низкопотенциальных гемов, то они предположительно принимают участие в окислении H₂S [455].

Последовательность процессов, катализируемых СоQ-цитохром c -редуктазой (см. рис. 23), по существу, представляет собой конкретный вариант Q-цикла, постулированного Митчелом в 1975 г. [1051]. Ключевой постулат этой схемы состоял в том, что пути каждого из двух электронов, приходящих на СоQ или уходящих с СоQH₂, оказываются различными. На сегодня это предположение твердо доказано по крайней мере для окисления СоQH₂. Установлено, что роль СоQH₂-оксидазы играет FeS, а СоQ⁺, образующийся из СоQH₂, окисляется затем гемом b_l цитохрома b . Существует чисто химическая предпосылка того обстоятельства, что СоQH₂ и СоQ⁺ окисляются разными ферментами: потенциалы хинона и семихинона очень различны (см. рис. 20).

По мнению ряда авторов, связывание СоQH₂ с FeS происходит таким образом, что гидрохиноновая «головка» оказывается вблизи какой-то положительно заряженной группировки, предположительно Fe³⁺. Это вызывает сдвиг рК гидрохинона в кислую сторону, что облегчает его депротонирование. Потеряв протон, СоQH₂ превращается в СоQH⁺, который и окисляется посредством FeS. Депротонирование необходимо для окисления СоQH₂, так как редокс-потенциал пары СоQH₂/СоQH⁺ выше +850 мВ, а пары СоQH⁺/СоQH⁺ — около +190 мВ (данные для раствора СоQ в 80%-ном этаноле) [1250]. (О деталях структуры и функций комплекса bc_1 фотосинтезирующих бактерий см. обзоры: [412, 1250].)

3.1.4. Пути использования $\Delta\bar{p}H$, образованной циклической редокс-цепью

В хроматофорах протонный потенциал, образованный циклической редокс-цепью, может использоваться для совершения четырех видов химической работы. Среди них: 1) образование АТФ из АДФ и P_i посредством H⁺-АТФ-синтазы (см. раздел 5.1.1); 2) образование РР_i из двух молекул Р_i под действием H⁺-пиро-

фосфатсинтазы (см. раздел 5.1.2); 3) катализируемый NADH-CoQ-редуктазой обратный перенос восстановительных эквивалентов от доноров водорода с редокс-потенциалом около нуля к NAD^+ ; 4) восстановление $NADP^+$ посредством NADH под действием трансгидрогеназы (см. раздел 5.1.3).

NADH—CoQ-редуктаза представляет собой первый из трех $\Delta\bar{H}$ -генераторов, включенных в дыхательную цепь (см. раздел 3.4.3). Действуя в обратном направлении ($CoQH_2 \rightarrow NAD^+$), этот фермент в хроматофорах становится потребителем $\Delta\bar{H}$, образуемой фотосинтетической редокс-цепью. Он делает возможным восстановление NAD^+ (редокс-потенциал -320 мВ) за счет таких доноров водорода, как H_2S (редокс-потенциал около 0). Образующийся NADH затем используется в восстановительных биосинтезах.

Один из путей использования NADH — восстановление $NADP^+$ в трансгидрогеназной реакции. Фермент трансгидрогеназа служит потребителем $\Delta\bar{H}$. Он локализован, в частности, в мембране хроматофоров. Трансгидрогеназа, используя $\Delta\bar{H}$, резко увеличивает редокс-потенциал пары $NADPH/NADP^+$, что благоприятствует тем восстановительным синтезам, где используется NADPH в качестве донора водорода.

В темноте NADH—CoQ-редуктаза может действовать в прямом направлении ($NADH \rightarrow CoQ$), генерируя $\Delta\bar{H}$. Образующийся $CoQH_2$ окисляется комплексом bc_1 с восстановлением цитохрома c_2 . Последний восстанавливает цитохром o , который переносит

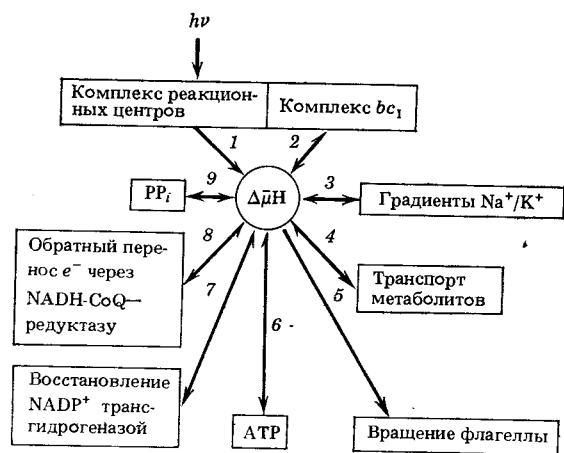


Рис. 33. Пути трансформации энергии света в цитоплазматической мембране пурпурных фотосинтезирующих бактерий

В хроматофорах тех же бактерий имеет место упрощенная схема, где отсутствуют пути 4, 5 и, может быть, также 3

сит электроны на O_2 [1481]. Есть наблюдения, что восстановление O_2 посредством цитохрома o сопряжено с генерацией $\Delta\bar{H}$ (см. раздел 3.4.5). Если это так, то оказывается, что пурпурные фотосинтезирующие бактерии располагают дыхательной цепью с тремя $\Delta\bar{H}$ -генераторами.

В цитоплазматической мембране фотосинтезирующих бактерий имеется целый ряд дополнительных потребителей $\Delta\bar{H}$, отсутствующих в хроматофорах. Среди них: 1) H^+ -моторы, вращающие бактериальные флагеллы; 2) H^+ , метаболит-симпортеры, обеспечивающие накопление метаболитов в бактериальной клетке; 3) системы транспорта Na^+ и K^+ , ответственные за поддержание асимметричного распределения этих катионов между клеткой и средой. Градиенты ионов Na^+ и K^+ действуют как $\Delta\bar{H}$ -буфер. Аналогичную роль может, по-видимому, играть и PP_i (см. разделы 6.3.1, 5.1.2).

Общая схема превращения энергии света в различные типы работы мембраны пурпурных фотосинтезирующих бактерий показана на рис. 33.

3.2. Нециклическая светозависимая редокс-цепь зеленых бактерий

В предыдущем разделе мы упоминали, что пурпурные фотосинтезирующие бактерии могут восстанавливать NAD^+ посредством H_2S за счет энергии света, предварительно превращенной в $\Delta\bar{H}$ циклической редокс-цепью. Зелеными фотосинтезирующими бактериями-анаэробами используется другой механизм. Он устроен таким образом, что свет одновременно вызывает генерацию $\Delta\bar{H}$ и восстановление NAD^+ сероводородом.

Механизм, о котором идет речь, представляет собой простейший вариант так называемой нециклической фотосинтетической редокс-цепи. Его схема приведена на рис. 34. Ряд стадий переноса электронов в этой цепи остается неясным. Твердо установлено, что свет вызывает фотоокисление БХл, относящегося к типу a , подобно БХл пурпурных бактерий. Неизвестно, в димерной или олигомерной форме находится БХл. Непосредственным окислителем для БХл a служит, по-видимому, другая молекула БХл [299, 1381].

Показано, что первичный стабильный акцептор электронов у *Chlorobium* имеет редокс-потенциал -540 мВ, напоминая в этом отношении ферредоксин в фотосистеме I хлоропластов (см. раздел 3.3.2). Он дает сигнал электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), типичный для FeS-протеидов ($g = 1,94$).

От FeS-компонента (или компонентов — их может быть два) электроны переносятся к NAD^+ . По аналогии с другими система-

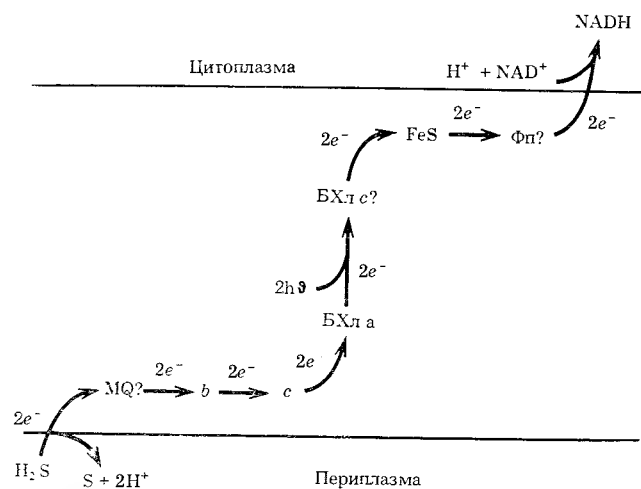


Рис. 34. Нециклическая фотосинтетическая редокс-цепь зеленых бактерий *b* и *c* — цитохромы; БХл *a* и БХл *c* — соответствующие бактериохлорофиллы, специфичные для зеленых бактерий; FeS — негемовый железопротеид; Фп — флавопротеид

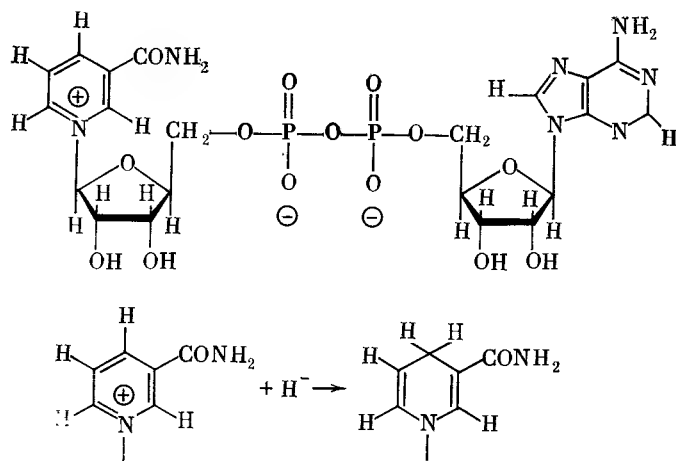


Рис. 35. Структура NAD^+ и механизм его восстановления до $NADH$, требующий присоединения двух электронов и одного протона
В $NADP(H)$ имеется дополнительный фосфатный остаток при С-2 рибозы аденилатной части динуклеотида

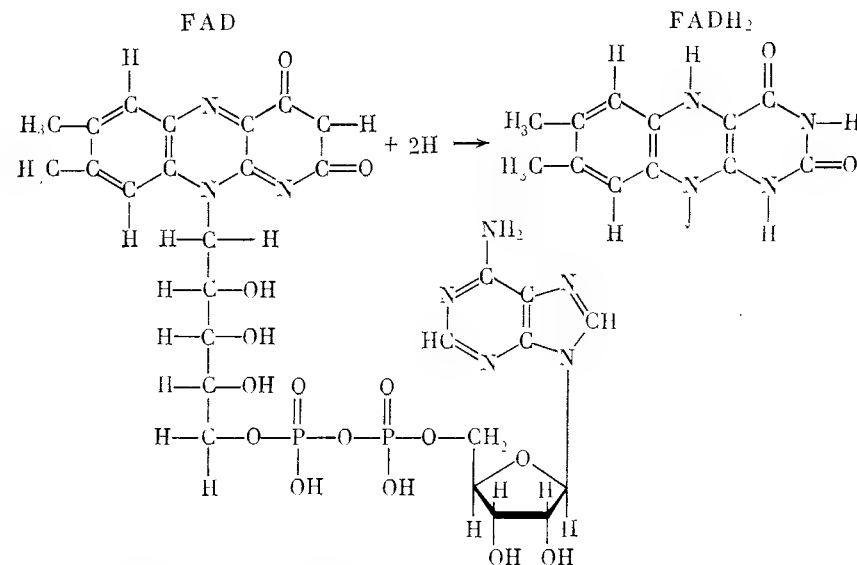


Рис. 36. Структура и механизм восстановления FAD
В FMN отсутствует остаток AMP

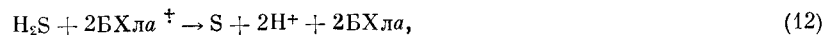
ми такого типа можно предположить участие в этом процессе флавинодержавшего белка. Структура и механизм восстановления NAD^+ и флавина показаны на рис. 35 и 36.

Фотоокисленный БХл *a* восстанавливается донорным сегментом редокс-цепи, берущей начало от H_2S . Этот участок содержит цитохром типа *b* и, по-видимому, два цитохрома типа *c*. Считается вероятным участием MQ и каких-то еще редокс-компонентов (см. обзор: [1136]). Окислительно-восстановительные потенциалы основных компонентов цепи зеленых бактерий были указаны на рис. 24.

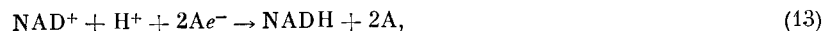
В. Д. Самуиловым [882] была показана светозависимая генерация $\Delta\bar{P}$ мембранными фрагментами зеленых бактерий, сорбированными на плоской фосфолипидной мембране. Вероятная природа этого эффекта может объясняться, как и в случае других хлорофиллсодержащих $\Delta\bar{P}$ -генераторов, переносом электронов поперек мембраны. Если перенос электронов происходит так, как это показано на рис. 34, то он должен приводить к освобождению ионов водорода во внешнюю среду из-за окисления H_2S до S электронодонорным сегментом редокс-цепи, который, как предполагается, расположен вблизи внешней поверхности цитоплазматической мембраны. На противоположной (внутренней) стороне мембраны должно происходить поглощение ионов H^+ , так как NAD^+ восстанавливается бактериохлорофилльной системой, транс-

портирующей электроны, но не протоны. Чтобы образовать $NADH$ из NAD^+ , присоединение двух электронов должно сопровождаться присоединением одного протона (см. рис. 35).

Итак, на внешней поверхности мембраны зеленой бактерии имеет место следующий процесс:



в то время как события, происходящие на противоположной стороне мембраны, описываются как



где $B\bar{X}la^+$ — свободный радикал фотоокислительного бактериохлорофилла типа *a*, а Ae^- — восстановленная форма первичного акцептора (см. обзор: [1136]).

Таким образом, схема переноса электронов у зеленых бактерий предполагает, что и генерация $\Delta\bar{p}H$, и восстановление NAD^+ осуществляются одной и той же светозависимой редокс-цепью.

К сожалению, энергетика зеленых бактерий изучена слишком фрагментарно, чтобы утверждать, что приведенная схема полностью верна. Поэтому мы не будем вдаваться в детали рассматриваемого механизма, а ограничимся его самым общим описанием, приведенным выше.

Следует отметить, что схема, представленная на рис. 34, применима лишь к анаэробным зеленым бактериям. В то же время известно, что зеленые бактерии, относящиеся к факультативным аэробам, имеют циклическую редокс-цепь, напоминающую таковую пурпурных бактерий [262, 317].

3.3. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов и цианобактерий

Нециклическая светозависимая редокс-цепь цианобактерий и хлоропластов до известного предела аналогична цепи зеленых бактерий. В обоих случаях свет используется для генерации $\Delta\bar{p}H$ и восстановления $NAD(P)^+$ посредством донора электронов с более положительным, чем у $NAD(P)^+$, редокс-потенциалом. Главное отличие цианобактерий и хлоропластов от зеленых бактерий состоит в том, что донором электронов служит вода. Разность редокс-потенциалов между $NADP^+$ и H_2O составляет около 1,2 В, что намного больше, чем разность потенциалов между NAD^+ и H_2S , используемых зелеными бактериями (0,3 В). Вот почему транспорт одного электрона по редокс-цепи хлоропластов (цианобактерий) сопряжен с поглощением двух фотонов, а не одного, как у зеленых бактерий.

В растительных клетках фотосинтетическая редокс-цепь локализована во внутрехлоропластных мембранах, в основном в тилакоидах — замкнутых сплюснутых мембранных пузырьках, собранных в пачки (граны). Тилакоиды обнаружены также у многих цианобактерий.

3.3.1. Принцип действия

На рис. 37 показан упрощенный вариант светозависимой редокс-цепи в тилакоидной мембране хлоропластов. В его основу положена так называемая Z-схема фотосинтеза, выдвинутая в 1960 г. Хиллом и Бенделом [720]. Механизм включает два типа реакционных центров (здесь они называются фотосистемами I и II), а также несколько ферментов, катализирующих темновые реакции окисления воды, Q-цикла и восстановления $NADP^+$.

Процесс начинается поглощением фотона хлорофиллом антенны. Возбуждение мигрирует от Хл антенны к Хл одной из фотосистем. Если это Хл фотосистемы II (максимум поглощения при 680 нм), он окисляется Фео, от которого электроны переносятся на связанный пластохинон (PQ_A ; формула PQ была дана на рис. 19). Подобно Q_A в бактериальном фотосинтезе, этот хинон как-то связан с негемовым железом. Затем электрон достигает другой молекулы связанного PQ (PQ_B). Катион-радикал окисленного хлорофилла ($Хл_{680}^+$) принимает электрон от неидентифицированного донора Z, который, в свою очередь, восстанавливается электронами, отнятыми у молекулы H_2O посредством довольно сложной марганецсодержащей системы расщепления воды (С.Р.В.). При расщеплении воды наряду с электронами образуются молекулярный кислород и протоны. Последние освобождаются в раствор внутри тилакоидов. Что касается восстановленного PQ , он окисляется PQH_2 -пластоцианин-редуктазой, или комплексом b_6f (это хлоропластный аналог комплекса bc_1). Комплекс b_6f включает двухмоновый цитохром *b* (гемы b_l и b_h), FeS и цитохром *f*, который функционально аналогичен цитохрому c_1 .

Считается, что комплекс b_6f катализирует Q-цикл, подобный тому, что описан у пурпурных бактерий и митохондрий. Если это действительно так, то перенос одного электрона с PQ на цитохром *f* оказывается сопряженным с транслокацией одного заряда через мембрану тилакоида, поглощением двух H^+ из стромы и освобождением двух H^+ во внутритилакоидное пространство. Поглощение протонов происходит на внешней поверхности мембраны тилакоида, а их выделение — на внутренней ее поверхности.

От цитохрома *f* электрон движется к медьсодержащему белку пластоцианину, который восстанавливает катион-радикал хлорофилла фотосистемы I (максимум поглощения при 700 нм). $Хл_{700}^+$ образуется при окислении возбужденного $Хл_{700}$. Электроны, от-

x

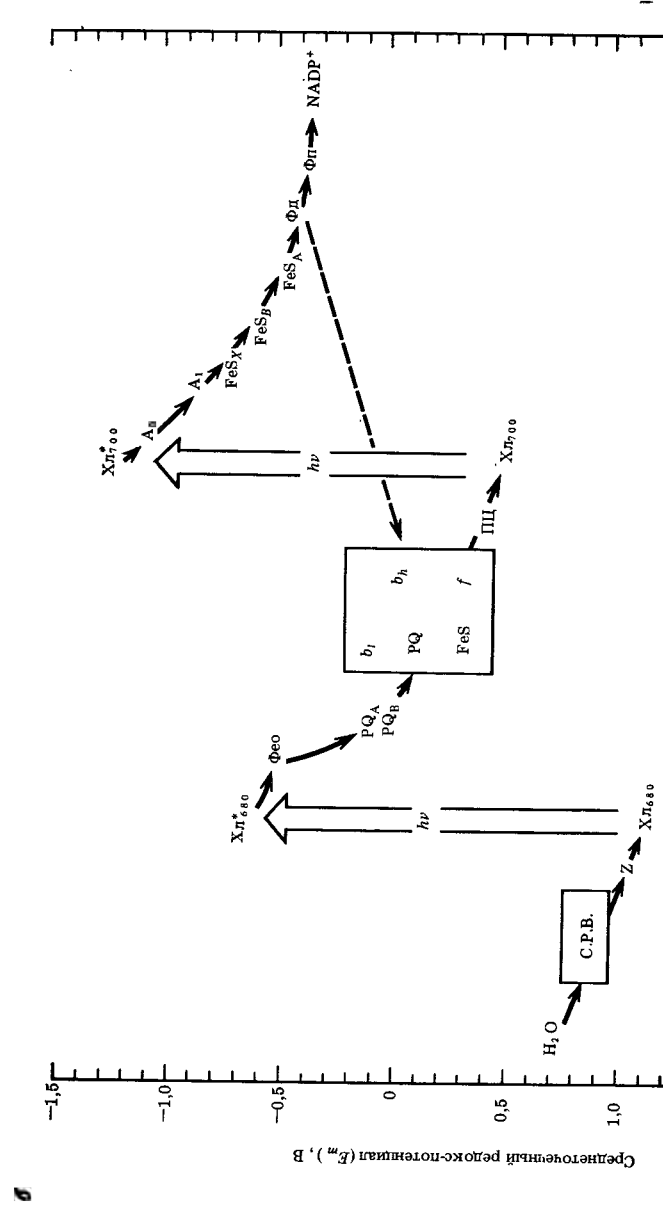
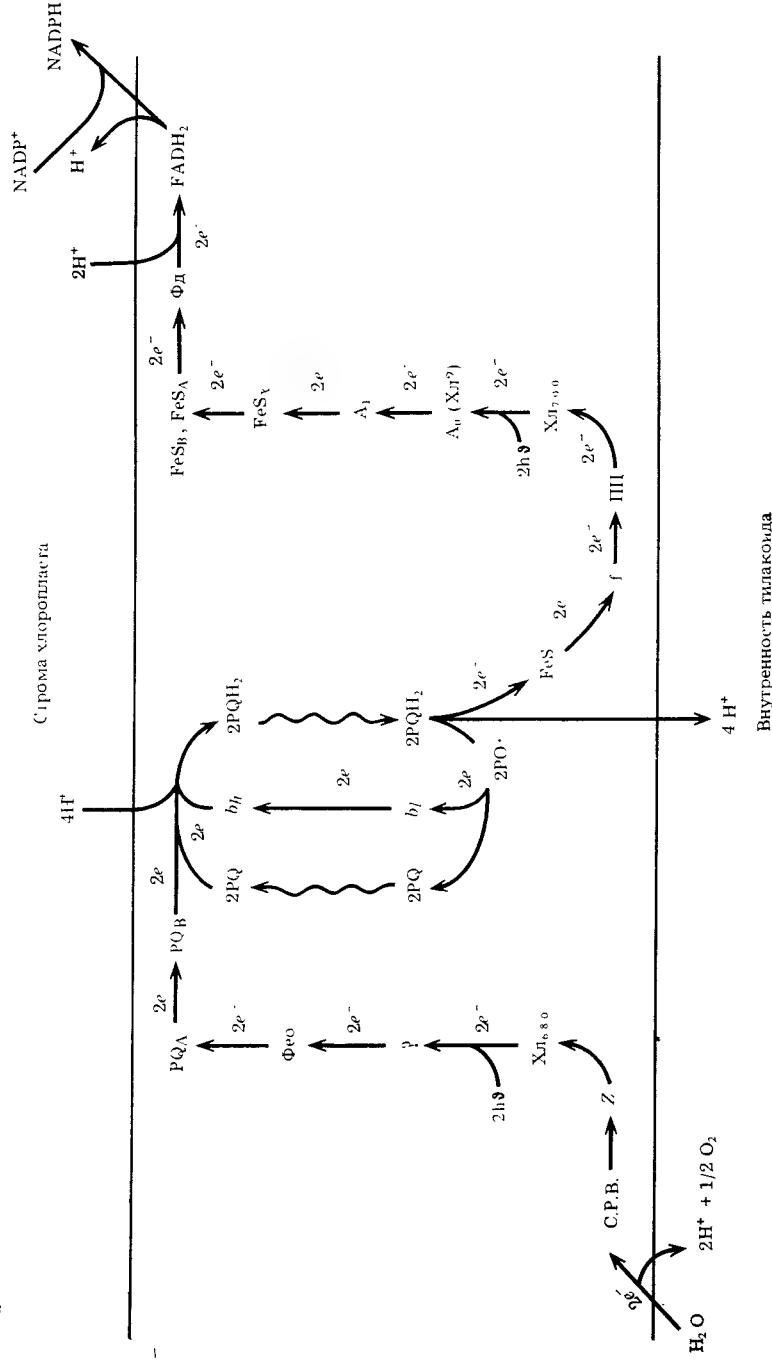


Рис. 37. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов

С. Р. В. — система расщепления воды; *Z* — неизвестный донор электронов фотосистемы II; X_{700} — хлорофиллы фотосистемы II; PQ A и PQ B — пластохиноны, связанные с фотосистемой I; PQ — свободный пластохинон; b_h и b_l — высоко- и низкпотенциальные геммы цитохрома b_6/f ; f — цитхром; III — пластогемин; X_{700} — хлорофиллы фотосистемы I; А₁ и А₂ — промежуточные акцепторы электронов фотосистемы I; FeS X — первый стабильный акцептор электронов фотосистемы I; Fecl и FeSR — два железосерных кластерона фотосистемы I; Fecal и FecsR — ферредоксин к б₆/f-комплекс, циклический фотоэлектроцепь (по: Бланкеншип и Принс [1982])

нятые от X_{L700}^* , переносятся через неизвестные редокс-центры A_0 и A_1 (одним из них может быть X_{L693}) на какой-то железосерный центр FeS_x , играющий роль первичного стабильного акцептора в фотосистеме I. На следующем этапе электрон транспортируется на другие железосерные кластеры (FeS_B , FeS_A , ферредоксин) и далее на флавопротеид, содержащий FAD в качестве простетической группы. От FAD восстановительные эквиваленты поступают на $NADP^+$. Образованный в результате NADPH окисляется водорастворимой системой ферментов, восстанавливающих CO_2 до сахара ($-CHON-$)_n.

Согласно схеме, изображенной на рис. 37, эффективность нециклической редокс-цепи хлоропластов и цианобактерий должна быть $6 H^+$ на $4h\nu$, что соответствует отношению H^+/e^- , равному 3 (имеется в виду отношение количества протонов, перенесенных через мембрану, к количеству электронов, прошедших весь путь от H_2O до CO_2). В рамках этой концепции можно утверждать, что редокс-цепь тилакоидов содержит три $\Delta\bar{P}H$ -генератора: фотосистему I, фотосистему II и комплекс b_6f (см. обзоры: [263, 408, 1084, 1136]).

3.3.2. Фотосистема I

3.3.2.1. Субъединичный состав

Фотосистема I из хлоропластов включает по крайней мере четыре различных полипептида с молекулярными массами 83,2; 82,5, 18 и 15 кДа. Опыты с антителами показали, что субъединица I значительно выступает из мембраны. Отмечена ее организующая роль в сборке остальных субъединиц фотосистемы I.

Расшифрованы первичные структуры двух крупных полипептидов фотосистемы I [408, 1084]. Показана их гомология, достигающая 45%. Есть указания, что X_{L700} и промежуточные акцепторы электронов A_0 и A_1 связаны с двумя крупными субъединицами, а FeS_x , FeS_A и FeS_B — с мелкими гидрофобными субъединицами фотосистемы I (см. обзоры: [408, 1084, 1136]).

3.3.2.2. Механизм переноса электронов

Первичным светоиндуцированным процессом, происходящим в фотосистеме I, служит сдвиг электронов от X_{L700}^* , роль которого, по-видимому, играет димер $X_L a$ [1377, 1577], к промежуточному акцептору A_0 . Есть основания полагать, что функцию A_0 выполняет другой $X_L a$ [1380]. Почти ничего не известно о природе следующего редокс-центра — A_1 . Может быть, его роль играет витамин K_1 [1353]. Считается, что окислительно-восстановительные потенциалы A_0 и A_1 более отрицательны, чем потенциалы первичного стабильного акцептора FeS_x ($-0,73$ В).

Судя по оптическим и месбауэровским спектрам, FeS_x представляет собой кластер, содержащий четыре иона железа и четыре иона сульфида (см. рис. 22) [281, 298, 953]). Кроме этого компонента, в фотосистеме I находят еще два $4Fe-4S$ -кластера: FeS_A и FeS_B . Их редокс-потенциалы равны соответственно $-0,53$ В и $-0,58$ В.

Вероятная последовательность реакций в этой части редокс-цепи следующая: $FeS_x \rightarrow FeS_B \rightarrow FeS_A$. Последний компонент служит, по-видимому, восстановителем ферредоксина, водорастворимого FeS -белка (11 кДа), который принимает участие в переносе электронов на флавопротеид, восстанавливающий $NADP^+$ (34 кДа).

Другой водорастворимый переносчик электронов — медьсодержащий белок пластоцианин — играет роль восстановителя фотоокисленного X_{L700} . В первичной структуре пластоцианина обнаружена гомология с субъединицей II цитохромоксидазы — конечного фермента дыхательной цепи, содержащего медь и железо (см. раздел 3.4.5.2).

Пластоцианин имеет высокое сродство к фотосистеме I. По-видимому, прочно связанный пластоцианин ответствен за быстрое (20 мкс) восстановление X_{L700}^+ . Кроме того, описан и в 10 раз более медленный процесс восстановления X_{L700}^+ пластоцианином (см. обзоры: [262, 412, 1170, 1136]).

Восстановителем пластоцианина является цитохром f , принадлежащий комплексу b_6f . Последний осуществляет перенос электронов от фотосистемы II к фотосистеме I.

Существует альтернативный способ функционирования фотосинтетической редокс-цепи в хлоропластах, а именно циклический перенос электронов с участием фотосистемы I и комплекса b_6f , но без фотосистемы II. Такой механизм *in vitro* можно продемонстрировать, блокировав фотосистему II диуроном и добавив искусственный переносчик электронов ФМС. В некоторых условиях циклический перенос электронов можно наблюдать и *in vivo*. Предполагается, что в этом случае восстановительные эквиваленты транспортируются от ферредоксина не к $NADP^+$, а назад к X_{L700}^+ . В этом процессе принимают участие PQ и комплекс b_6f . Предполагается, что ферредоксин восстанавливает PQ, так что фотосистема II становится не нужной для регенерации X_{L700} из X_{L700}^+ . Подобный механизм аналогичен циклической светозависимой редокс-цепи пурпурных бактерий, образующей $\Delta\bar{P}H$ без фотоллиза воды и восстановления $NADP^+$ (см. обзор: [412]).

3.3.2.3. Механизм генерации $\Delta\bar{n}$

Нет сомнений, что фотосистема I способна генерировать $\Delta\bar{n}$. Этот комплекс был встроен в протеолипосомы, которые на свету образовывали $\Delta\bar{n}$ до 3 единиц. Чтобы активировать циклический перенос электронов, в инкубационную среду добавили ФМС и аскорбат [1140]. Включение очищенной H^+ -АТФ-синтазы в те же протеолипосомы давало систему, катализирующую фотофосфорилирование [1098, 693].

Механизм генерации $\Delta\bar{n}$ фотосистемой I, по всей вероятности, подобен таковому бактериальными реакционными центрами. Как было показано при измерении $\Delta\bar{n}$ по каротиноидному сдвигу [1607] и путем прямой регистрации в системе протеолипосомы — коллоидная пленка [71] (см. также: [953]), наносекундная вспышка лазера вызывает очень быструю ($\tau < 100$ нс) генерацию $\Delta\bar{n}$, которая гораздо быстрее всех процессов, происходящих в фотосистеме I, кроме переноса электронов на этапе $X_{L700}^* \rightarrow FeS_x$. Эта $\Delta\bar{n}$ составляет большую часть электрогенного ответа, так что все прочие этапы переноса электронов в фотосистеме I могут внести лишь сравнительно малый вклад в трансформацию энергии на этом участке фотосинтетической редокс-цепи.

Такие соотношения вряд ли удивительны, если учесть хорошо известные факты, касающиеся локализации в мембране компонентов фотосистемы I. Показано, что пластоцианин, восстанавливающий фотосистему I, смотрит внутрь тилакоида, а ферредоксин и ферредоксин-NADP⁺-редуктаза, окисляющие ее, обращены наружу. Поэтому транспорт восстановительных эквивалентов через фотосистему I должен быть направлен поперек мембраны. Электрические измерения показывают, что фотосистема I, подобно бактериальным реакционным центрам, осуществляет электрически не компенсированный трансмембранный перенос электронов.

Итак, фотосистема I может быть описана в первом приближении Митчелловой электрон-транспортной «полупетлей».

Однако нельзя исключить, что дальнейшие количественные исследования могут выявить какие-то небольшие медленные электрогенные стадии, обусловленные движением протонов, а не электронов. Напомним, что в реакционных центрах пурпурных бактерий 5% общей $\Delta\bar{n}$ генерируется за счет переноса протонов, а не электронов (см. раздел 3.1.2.4).

3.3.3. Фотосистема II

Фотосистема II состоит из пяти типов полипептидов с молекулярными массами 56 кДа; 52; 39,5; 39; 9,5 и 4,5 кДа. Недавно была определена последовательность аминокислот во всех этих субъединицах [161, 408, 711, 894, 1084, 1306].

X_{L680} , входящий в состав фотосистемы II, относится к группе хлорофиллов *a*. Возможно, что X_{L680} является димером. Раньше считалось, что он связан с тяжелыми субъединицами фотосистемы II. Однако это предположение было поколеблено после выяснения аминокислотных последовательностей. Оказалось, что субъединицы массами 39 и 39,5 кДа похожи на M- и L-субъединицы комплекса бактериальных реакционных центров [408, 700]. Подобно этим субъединицам, они несут центры связывания первичного и вторичного хинонов (в этом случае — PQ_A и PQ_B). Субъединица 39 кДа специфически связывает гербициды [408].

Две наиболее легкие субъединицы (9,5 и 4,5 кДа) образуют цитохром типа *b* с максимумом α -пика при 559 нм (цитохром b_{559}). Каждая из субъединиц содержит по одному гистидину, образующему координационную связь с гемом [1084, 1589].

Отличительной чертой фотосистемы II является очень высокий редокс-потенциал основной формы пигмента, т. е. пары X_{L680}/X_{L680}^+ . Он равен +1,1 В. Вот почему X_{L680} может служить акцептором электронов для воды (редокс-потенциал пары H_2O/O_2 при нейтральном pH равен +0,82 В). В то же время редокс-потенциал возбужденного X_{L680} лежит в отрицательной области (менее -0,6 В). Промежуточным акцептором электронов между X_{L680}^* и первичным стабильным акцептором служит Фео (редокс-потенциал -0,61 В).

Первичный стабильный акцептор является хиноном (PQ_A), который как-то связан с негемовым железом. Еще одна молекула связанного хинона (PQ_B) участвует в дальнейшем переносе электронов по фотосинтетической редокс-цепи. Как и у пурпурных бактерий, этот этап блокируется *o*-фенантролином [546, 1136, 1187, 1306].

Нет ясности в вопросе о том, что за компонент служит первичным донором электронов для X_{L680}^+ . Это гипотетическое соединение *Z* восстанавливает X_{L680}^+ за времена порядка 50—500 нс. Есть косвенные указания, что окисленная форма *Z* — это дважды протонированный катион семихинона ([1306]; см., однако, [448]).

В качестве восстановителя *Z* используется система расщепления воды С. Р. В. Она действует таким образом, что расщепление двух молекул H_2O приводит к восстановлению четырех X_{L680}^+ через компонент *Z* и образованию одной молекулы O_2 и четырех ионов H^+ . Четыре интермедиата были постулированы в этом четырехквантовом процессе. Их природа во многом остается неизвестной.

С. Р. В. включает полипептиды с массами 34, 23 и 16 кДа и, по-видимому, еще какой-то один белок. С. Р. В. содержит четыре иона Mn^{2+} . Последние принимают участие в переносе электронов С. Р. В. [200, 1306, 1308].

Роль цитохрома b_{559} , обнаруженного в фотосистеме II, также

остается загадкой. Есть предположение, что он участвует в особом циклическом переносе электронов вокруг фотосистемы II [412].

Механизм генерации ДФН фотосистемой II может, по-видимому, быть описан по аналогии с более изученным комплексом бактериальных центров и фотосистемой I.

Вероятно, и в этом случае также происходит трансмембранный светозависимый перенос электронов (от Хл_{680}^* к PQ_A , расположенному по другую сторону гидрофобного барьера, как это показано на рис. 37, а).

3.3.4. PQH_2 -пластоцианин-редуктаза

Система реакций Q-цикла катализируется в хлоропластах PQH_2 -пластоцианин-редуктазой (комплексом b_6f).

Комплекс содержит по крайней мере четыре полипептида. Три из них снабжены редокс-центрами. Это цитохром f (32 кДа), двухгемовый цитохром b_6 (23 кДа) и FeS-белок (20 кДа). Четвертая субъединица (17 кДа) прямо не участвует в переносе электронов [200, 385, 1193]. Субъединичный состав комплекса b_6f , а также фотосистем I и II приведен в табл. 3.

Таблица 3. Полипептидный состав фотосистем I, II и комплекса b_6f (по : Мерфи [1084])

Комплекс	Название, функция	Субъединицы (молекулярные массы в кДа)
Фотосистема I	A_1 и A_2 , связывание пигментов	{ 83,0
	FeS_X	{ 82,5
	FeS_B , FeS_A	{ 18,0 *
		{ 15,0 *
Фотосистема II	?	56,0
	?	52,0
	Связывание пигментов, PQ_A , PQ_B	{ 39,5
		{ 39,0
b_6f	Цитохром b_{559}	{ 9,5
		{ 4,5
	Цитохром f	32,0
	Цитохром b_6	23,0
	FeS_{III}	20,0 *
	Белок, связывающий цитохром b_6	17,0

* Молекулярные массы приведены не по данным аминокислотных последовательностей, а по электрофорезу в додецилсульфате натрия, что может приводить к ошибке до 20%.

Оба гема в цитохроме b_6 характеризуются спектральным α -максимумом при 563 нм. Они отличаются по редокс-потенциалам. Гемы b_l и b_h имеют E_m соответственно -150 мВ и -30 мВ [386].

Сравнение аминокислотной последовательности цитохрома b_6 из хлоропластов шпината с таковыми цитохромов b из митохондрий животных, растений и грибов выявило сходство в первых (считая от N-конца) 200 остатках [1590, 1301]. В то же время налицо и явное различие, состоящее в том, что цитохром b_6 существенно короче (211 остатков), чем митохондриальные цитохромы b_6 (380—385 остатков). При этом обнаруживается гомология между субъединицей IV (17 кДа) комплекса b_6f и остатками 260—353 митохондриального цитохрома b [704]. Поэтому можно полагать, что некая функция, присущая C-концевой части митохондриального цитохрома b , в хлоропластах выполняется субъединицей IV. Согласно Крамеру и соавт. единый полипептид цитохрома b , кодируемый одним из генов митохондрий, в хлоропластах закодирован геном, расщепленным на две части [408].

Цитохром b_6 содержит пять гистидинов, четыре из которых участвуют в координировании гемов b_l и b_h . Гистидины в положениях 82, 96, 183 и 198 (в митохондриях 197) полностью консервативны, т. е. встречаются как в цитохроме b_6 , так и во всех цитохромах b митохондрий из разных царств живых организмов. Они всегда локализованы в гидрофобных сегментах полипептидной цепи. По этим причинам названным гистидинам приписывают участие в связывании гемов b_l и b_h .

Анализ распределения гидрофобных и гидрофильных аминокислот вдоль полипептидной цепи цитохрома b_6 выявил наличие пяти гидрофобных участков, связанных четырьмя гидрофильными отрезками. Была предложена модель трехмерной структуры цитохрома b_6 , согласно которой его полипептид образует пять α -спиральных колонн, пересекающих мембрану (рис. 38).

В этой модели четыре инвариантных гистидина локализованы во второй и пятой колоннах, считая от N-конца. Они занимают такое положение, что два гема оказываются в гидрофобной части мембраны, будучи ориентированы перпендикулярно ее поверхности.

Каждый гем b содержит два отрицательно заряженных остатка пропionato. В рассматриваемой модели эти группы находятся против консервативных аргининовых остатков, заряженных положительно (рис. 39).

Расстояние между краями гемов, согласно модели, равно 1,2 нм, а между атомами железа — 2 нм [1301, 1590]. Следовательно, электрон, чтобы переместиться с гема b_l на гем b_h , должен пересечь около половины гидрофобного барьера мембраны. Это соответствует данным измерений, показавших, что перенос электронов на этапе $b_l \rightarrow b_h$ в митохондриях и бактериях ответствен за генерацию около 40% общей ДФН, образуемой комплек-

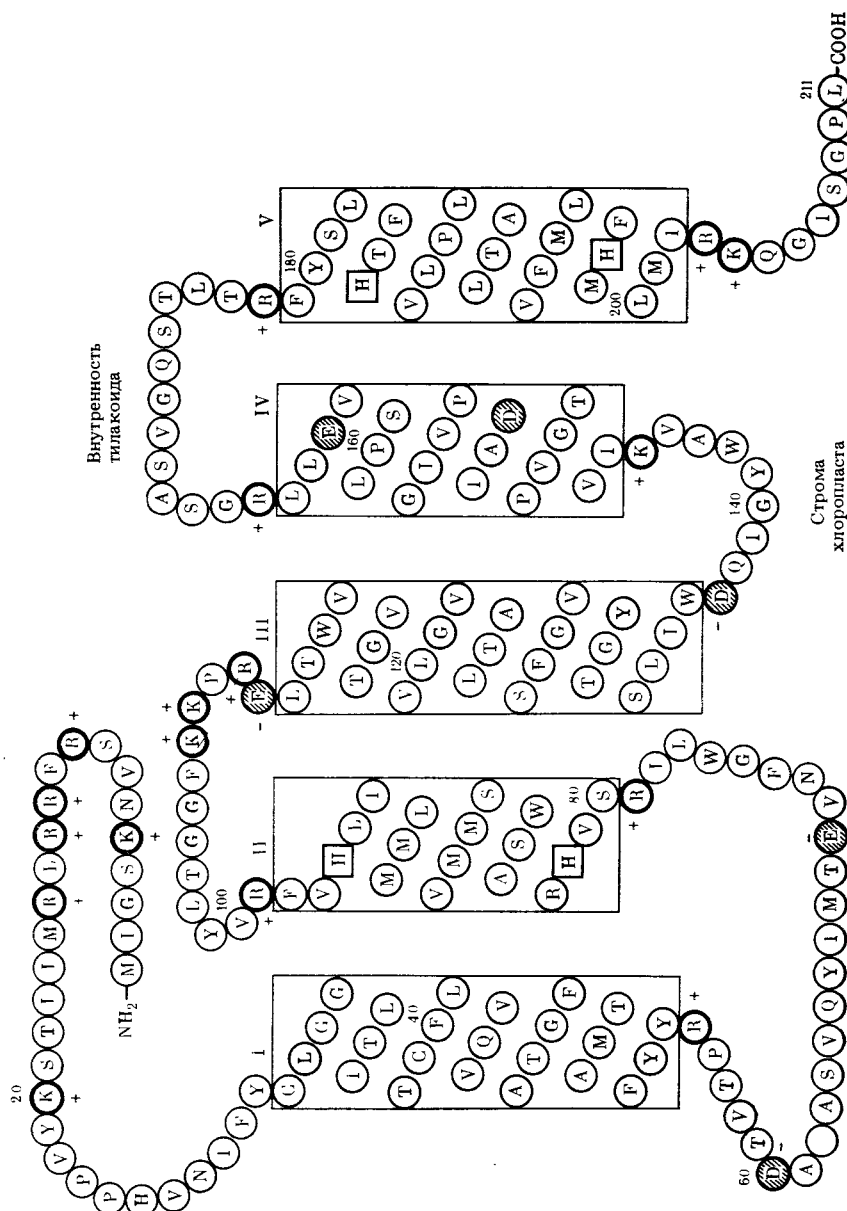
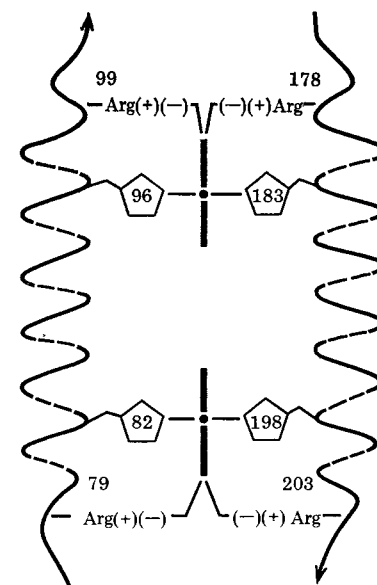


Рис. 39. Гипотетическое транс-мембранное расположение двух гемов (жирные вертикальные линии) цитохрома b_6

Верхний и нижний гемы соответствуют b_L и b_H . Показана возможная стабилизация отрицательно заряженных (—) пропионатных групп гемов наиболее консервативными аргининовыми остатками (+). Предполагаемые номера α -спиральных колонн (по: Крамер и соавт. [408]): слева—II, справа—V



сом bc_1 (см. разделы 3.1.3 и 3.4.4.2). Оставшаяся часть генерируется, по-видимому, за счет переноса протонов, как это изображено на рис. 37, а. Существенно, что разность редокс-потенциалов гемов b_L и b_H в цитохроме b_6 составляет порядка 120 мВ, что примерно вдвое меньше общей $\Delta\bar{p}H$, поддерживаемой на сопрягающих мембранах работой $\Delta\bar{p}H$ -генераторов.

Партнером цитохрома b_6 в реакции окисления RQH_2 служит железосерный белок комплекса b_6f , функционально аналогичный компоненту FeS_{III} дыхательной цепи. О нем еще мало что известно. Зато следующий переносчик электронов — цитохром f — изучен очень хорошо.

Последовательность 285 аминокислот, образующих цитохром f (см. [408]), имеет фрагмент $Cys-X-Y-Cys-His$, характерный для места ковалентного связывания гема в цитохромах типа c . Он расположен в области 21—25 от N-конца. His-25 и Lys-145 или Lys-222 служат лигандами железа гема. Гем локализован в большом N-концевом домене (остатки 1—250), экспонированном в водное пространство внутри тилакоида. Остатки 251—270 имеют выраженный гидрофобный характер и, по-видимому, образуют α -спиральную колонну, которая, пересекая мембрану, могла бы играть роль якоря. Остальные 15 аминокислот от C-конца локализованы на внешней поверхности тилакоидной мембраны и могут

Рис. 38. Вероятная схема расположения полипептида цитохрома b_6 в мембране тилакоида, учитывающая чередование гидрофильных и гидрофобных участков

Четыре внутримембранных гистидина помечены квадратами. Заряженные аминокислоты показаны жирными (+) и заштрихованными (—) кружками. Предполагается, что многочисленные положительные заряды на внутренней поверхности мембраны участвуют в связывании отрицательно заряженных участков цитохрома f (по: Крамер и соавт. [408])

быть удалены протеазами. Участок 190—249 богат кислыми аминокислотами, обращенными внутрь тилакоида. Они участвуют, как полагают, во взаимодействии с кластером основных аминокислот цитохрома b_6 . Десять консервативных основных аминокислот на отрезке 58—154, по-видимому, участвуют в связывании следующего переносчика электронов — пластоцианина.

Митохондриальный цитохром c_1 , функциональный аналог цитохрома f , имеет мало общего с последним по конкретной первичной структуре, однако также содержит гем в гидрофильном домене на N-конце и гидрофобный якорь на C-конце [408].

Спектр цитохрома f имеет α -максимум при 555 нм. Редокс-потенциал этого цитохрома равен + 365 мВ.

Средний диаметр комплекса b_6f порядка 8,5 нм. Комплекс склонен димеризоваться. Полагают, что в природной мембране комплекс существует в виде димера [1076].

Следует отметить, что RQH_2 -пластоцианин-редуктаза является медленным и наиболее уязвимым звеном фотосинтетической редокс-цепи. Вход в Q-цикл от фотосистемы II блокируется мощным гербицидом дихлорфенилдиметилтиомочевинной [304]. Определенные этапы Q-цикла чувствительны к ДБТХ и $HQNO$. Последние два яда тормозят Q-цикл также в митохондриях и бактериях.

В то же время антимицин А, типичный ингибитор комплекса bc_1 , видимо, не влияет на нециклическую редокс-цепь в тилакоидах. Однако он блокирует циклический перенос электронов [1078].

Ингибиторный анализ редокс-цепи тилакоидов осложняется существованием путей переноса электронов альтернативных главной нециклической цепи, показанной на рис. 37. Наряду с циклическим переносом электронов вокруг фотосистемы I, а также, возможно, и фотосистемы II две фотосистемы могут быть связаны друг с другом и без участия Q-цикла. Для этого достаточно предположить, что в некоторых условиях оба электрона, поступающие на PQ, поставляются фотосистемой II, и оба электрона, снимаемые с RQH_2 , акцептируются фотосистемой I. Такое предположение не кажется чем-то невозможным, если учесть, что Xl_{680}^* — сильный восстановитель, а Xl_{700}^+ — мощный окислитель.

Как показали Иванов и соавт. [762], отношение H^+/e^- повышается с 2 до 3 при адаптации хлоропластов к сильному свету. Авторы полагают, что этот эффект обусловлен подключением Q-цикла, который, по их мнению, не функционирует у неадаптированных хлоропластов.

Как предполагает Рич [1250], Q-цикл включается только при условии, что приток электронов к комплексу b_6f происходит быстрее, чем их отток. Именно в этих условиях анион-радикал PQ (образованный при восстановлении FeS посредством RQH_2) имеет достаточно времени, чтобы покинуть FeS, достичь цитохрома

b и восстановить гем b_l , прежде чем FeS вновь окислится под действием цитохрома f . Если же, например, образующийся цитохром f^{2+} окисляется так быстро, что цитохром f^{3+} успевает окислить восстановленный FeS раньше, чем PQ^- покинул FeS, то, по Ричу, PQ^- отдает свой электрон на FeS, а не на b_l , и Q-цикл отключается. Реализуется ли эта возможность в природе, предстоит решить будущим исследователям (см. также [784]).

3.3.5. Судьба ДрН, образованной фотосинтетической редокс-цепью хлоропластов

Тилакоиды хлоропластов выполняют лишь две функции: восстановление $NADP^+$ и синтез АТФ, опосредованный образованием и использованием ДрН. Поэтому можно думать, что энергия ДрН количественно превращается в энергию АТФ посредством H^+ —АТФ-синтазы.

Для тилакоидов нет необходимости совершать осмотическую работу по транспорту метаболитов, поскольку внутритилакоидное водное пространство является, по существу, «энзиматически пустым». Единственный крупномасштабный процесс, происходящий на внутренней поверхности тилакоидной мембраны, это фотоллиз воды с образованием молекулярного кислорода. Мембрана не может быть барьером ни для субстрата этой реакции (H_2O), ни для ее продукта (O_2). Что касается превращения ADP и P_i в АТФ и $NADP^+$ в NADPH, то оба эти процесса локализованы на внешней поверхности тилакоида.

Обратный перенос электронов против градиента редокс-потенциала в тилакоидах отсутствует, поскольку проблему генерации «восстановительной силы» они решают, образуя NADPH нециклической цепью. В хлоропластах нет таких потребителей ДрН, как H^+ -моторы, вращающие флагеллы бактерий (о возможном исключении из этого правила см. раздел 5.3.4). Нет никаких указаний на участие тилакоидов в регуляторном образовании тепла.

Коль скоро в тилакоидах есть только одна ДрН-зависимая функция, отпадает необходимость забуферивать ДрН в той степени, как это обычно происходит у бактерий. Тем не менее тилакоиды располагают возможностью стабилизировать до известной степени уровень ДрН. Дело в том, что их мембрана проницаема для ионов Cl^- , K^+ и Mg^{2+} . Транспорт этих ионов по электрическому градиенту, образуемому ДрН-генераторами, приводит к превращению $\Delta\psi$ в ΔpH . Параллельно образуются ΔpCl , ΔpK и ΔpMg . В принципе все эти компоненты могли бы поддерживать образование АТФ в течение какого-то времени в условиях, когда интенсивность света снижается. Однако практически только ΔpH оказывается достаточно большой, чтобы быть выше пороговой величины, требуемой для включения H^+ —АТФ-синтазы. Поскольку в форме ΔpH можно запасти намного больше энергии, чем в

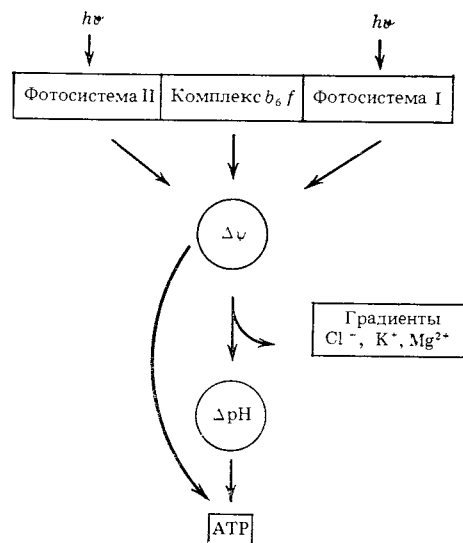


Рис. 40. Общая схема превращения энергии в мембранах тилакоидов

$\Delta\psi$ (см. раздел 6.3.1), переход $\Delta\psi \rightarrow \Delta pH$ повышает общее количество «мембранной» энергии в системе. Такой эффект может стабилизировать скорость синтеза АТФ хлоропластами в условиях колебаний освещенности, часто происходящих в природных условиях.

Общий план энергетики тилакоида изображен на рис. 40.

Последний существенный момент, который следует отметить при рассмотрении энергетики хлоропластов, состоит в том, что H^+ —АТФ-синтаза может отсутствовать в тех областях тилакоидов, где мембраны двух соседних тилакоидов тесно прилегают друг к другу. Такой эффект происходит при условии, что тилакоиды находятся в ненабухшем состоянии, т. е. имеют дисковидную форму. В этом случае между тилакоидами остается лишь очень узкая щель. Показано, что в данном состоянии молекулы H^+ —АТФ-синтазы сконцентрированы на самых краях диска, обращенных в сторону хлоропласта, и (главным образом) в мембранах ламелл, далеко выступающих из гран в строму. Ламеллы представляют собой, в сущности, продолжение некоторых из тилакоидов. Они содержат фотосистему I, в то время как в тилакоидах есть обе фотосистемы. Создается впечатление, что ламеллы специализированы на синтезе АТФ, сопряженном с циклическим переносом электронов вокруг фотосистемы I, и не способны к фотолизу воды и восстановлению $NADP^+$. Эти последние процессы протекают, в тилакоидах.

Чтобы образовать АТФ, генерируемая тилакоидом ΔpH должна быть передана вдоль мембраны в ламеллу, где локализована большая часть молекул H^+ —АТФ-синтазы.

Если тилакоиды находятся в набухшем состоянии, то молекулы H^+ —АТФ-синтазы диффундируют из ламелл в тилакоиды и равномерно распределяются по всей системе внутриверхлоропластных мембран. Более детальное обсуждение этой проблемы и соответствующие ссылки будут даны ниже в разделе 6.2.2.

Все, сказанное выше, может быть отнесено также к тилакоидам

цианобактерий, которые явились эволюционными предшественниками хлоропластов. В этом случае необходимо лишь дополнить схему на рис. 40 дыхательной цепью, которая у цианобактерий находится в той же тилакоидной мембране, что и фотосинтетическая редокс-цепь. (У растений дыхательная цепь вынесена в митохондрии.) Взаимодействие дыхательной и фотосинтетической цепей, обслуживаемых на средних своих участках одними и теми же компонентами Q-цикла, будет рассмотрено в главе, посвященной дыханию (раздел 3.4.4.3).

3.4. Дыхательная цепь

Термин «дыхательная цепь» используется для определения последовательности реакций, ответственных за перенос атомов водорода или электронов от субстратов к молекулярному кислороду.

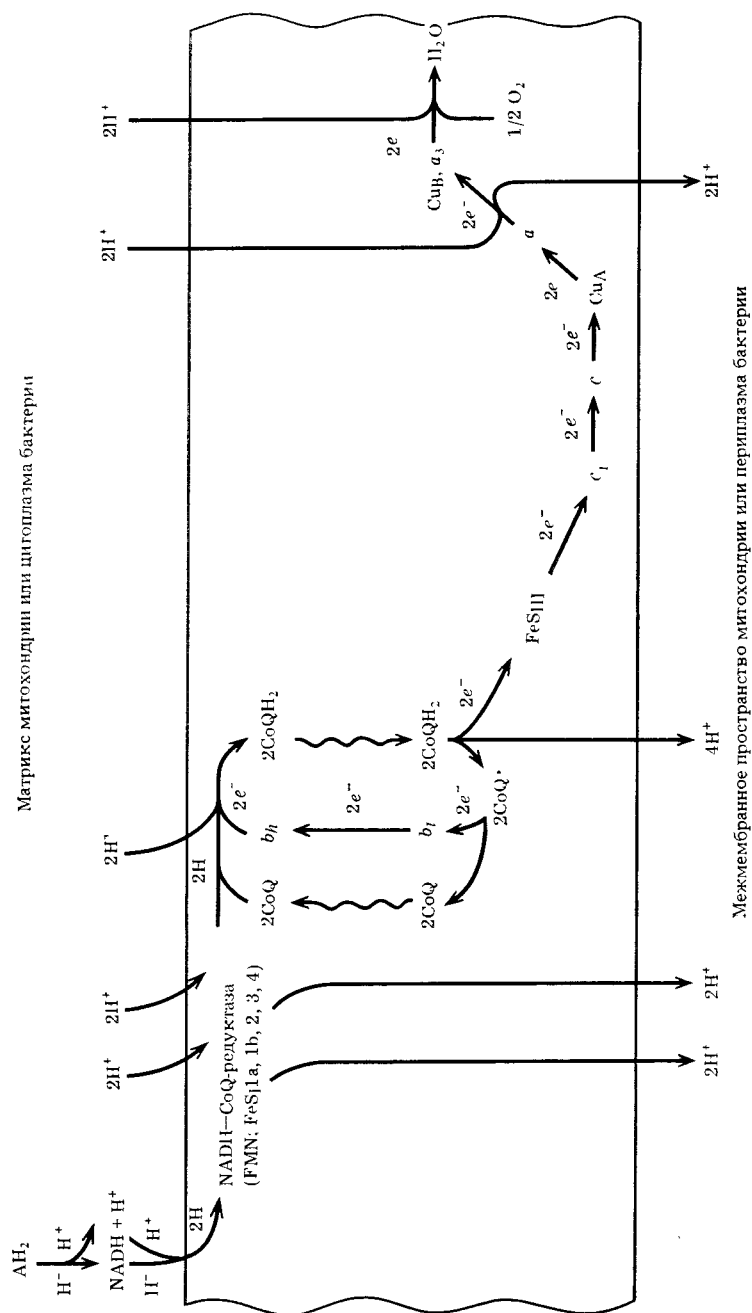
С точки зрения биоэнергетики следует различать два типа дыхательных цепей: сопряженные с трансформацией энергии и не сопряженные с ней. Биологическое значение дыхания первого типа стало ясным благодаря пионерским работам В. А. Энгельгардта, открывшего в начале тридцатых годов дыхательное фосфорилирование [146, 536]. Что касается дыхания второго типа, то первые указания на его активную роль были получены почти на 30 лет позже. Концепция, предполагающая, что несопряженное дыхание может быть биологически полезным, была сформулирована в нашей группе в 1960 г. Такое несопряженное, но полезное дыхание, названное нами «свободным дыханием» [122, 135, 1393], будет рассмотрено в одном из последующих разделов (6.1.1). Предметом настоящей главы является сопряженная дыхательная цепь.

3.4.1. Принцип действия

В клетках эукариот дыхание, сопряженное с трансформацией энергии, локализовано во внутренней мембране митохондрий. У дышащих бактерий тот же процесс обнаруживается в цитоплазматической мембране, мезосомах или тилакоидах.

$NADH$ -оксидазная система, катализирующая окисление $NADH$ кислородом, представляет собой главный механизм сопряженной дыхательной цепи. Эта система, показанная на рис. 41, включает три ферментных комплекса: $NADH$ — CoQ -редуктазу (комплекс I), $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазу (комплекс bc_1 , или комплекс III) и цитохромоксидазу (комплекс IV).

Еще один комплекс, а именно сукцинат- CoQ -редуктаза (другие названия сукцинатдегидрогеназа и комплекс II), переносит восстановительные эквиваленты от сукцината на CoQ без участия NAD^+ . Эта изоэнергетическая реакция, сама по себе не связанная



a

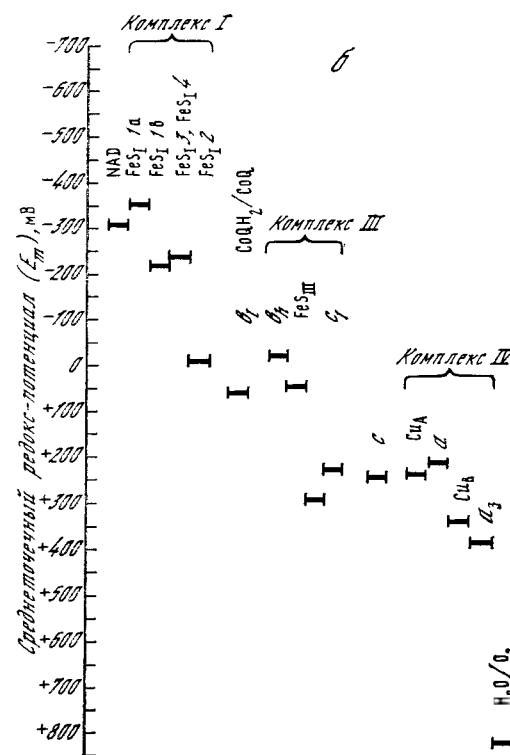


Рис. 41. Митохондриальная дыхательная цепь

а — возможная локализация в мембране компонентов дыхательной цепи;

б — редокс-потенциалы компонентов дыхательной цепи.

AN_2 — дыхательный субстрат; FeS_{11a}, 1b, 2, 3, 4 — соответствующие FeS-центры NADH—CoQ-редуктазы; b_h и b_l — соответственно высоко- и низкпотенциальные гемы цитохрома b;

FeS_{III} — FeS-центр комплекса $b c_1$;

c_1 , c, a и a_3 — цитохромы

с преобразованием энергии, не будет рассматриваться в данном контексте.

Как показано на рис. 41, последовательность реакций дыхательной цепи начинается окислением NADH. В процессе участвуют несколько редокс-центров NADH—CoQ-редуктазного комплекса, а именно FMN, и, по-видимому, пять FeS-кластеров, обозначаемых FeS_{11a}, FeS_{11b}, FeS_{11c}, FeS_{11d} и FeS_{11e}. NADH—CoQ-редуктаза восстанавливает CoQ. Полученный CoQH₂ окисляется системой Q-цикла, включающей FeS-кластер комплекса III (FeS_{III}) и два гема цитохрома b (высокопотенциальный b_h и низкпотенциальный b_l). Непосредственным акцептором электронов для CoQH₂ служит FeS_{III}. От FeS_{III} электроны поступают на цитохром c_1 и далее на цитохром c. Последний используется как восстановитель конечного фермента дыхательной цепи — цитохромоксидазы, имеющей в своем составе два гема (a и a_3) и два атома Cu. Цитохромоксидаза восстанавливает кислород до воды.

Процесс окисления NADH кислородом сопряжен с переносом до 10 ионов H^+ из митохондриального матрикса (у бактерий — из цитоплазмы) в межмембранное пространство митохондрии

(у бактерий — в периплазму). Каждый из комплексов I, III и IV сам по себе способен транслоцировать ионы H^+ через мембрану и потому может быть отнесен к ферментам — ДРН-генераторам.

Механизм генерации ДРН $NADH-CoQ$ -редуктазой остается неизвестным. Неясно даже число протонов, переносимых через мембрану в расчете на одну молекулу окисленного $NADH$ (отношение $H^+/2e^-$). По-видимому, оно больше двух (скорее всего 4, см. ниже) [924, 1594].

В то же время достаточно надежно показано, что $CoQH_2$ -цитохром c -редуктаза транспортирует два заряда на каждую пару перенесенных электронов. При этом четыре протона поглощаются из матрикса и четыре протона выделяются снаружи митохондрий. Механизм генерации ДРН подобен таковому в гомологичных комплексах bc_1 и в фотосинтетических редокс-цепях.

Перенос $2e^-$ цитохромоксидазой сопровождается поглощением четырех протонов из матрикса и выделением двух протонов на внешней поверхности митохондриальной мембраны. Принцип действия неясен. Предполагается, что, как и в Q-цикле, здесь происходит встречное движение электронов и протонов.

3.4.2. Источники восстановительных эквивалентов

Восстановительные эквиваленты могут поступать в дыхательную цепь на различных ее уровнях в зависимости от редокс-потенциала окисляемого субстрата. Если этот потенциал оказывается меньше, равен или лишь немногим больше $-0,3$ В (редокс-потенциал пары $NADH/NAD$), то в окислении такого субстрата может участвовать вся дыхательная цепь. Именно так окисляется большинство субстратов дыхания. Часто NAD^+ служит непосредственным окислителем субстрата. Примерами могут быть две (из четырех) реакции дегидрогенизации в цикле Кребса (окисление изоцитрата и малата); вторая реакция дегидрогенизации в системе β -окисления жирных кислот (окисление 3-оксиацил- CoA), гликолитическая оксидоредукция (окисление 3-фосфоглицеринового альдегида), а также окисление лактата, β -оксибутирата и некоторых других субстратов.

В редких случаях $NADP^+$ (а не NAD^+) служит окислителем субстрата. Образующийся $NADPH$ может, в принципе говоря, затем восстановить NAD^+ посредством трансгидрогеназной реакции. Однако этого не происходит в энергизованной мембране, так как фермент трансгидрогеназа является потребителем ДРН, действующим в направлении $NADH \rightarrow NADP^+$ (см. раздел 5.1.3). По этой причине $NADPH$ обычно не подключается к дыхательной цепи, а используется в реакциях восстановительных биосинтезов.

Если редокс-потенциал субстратов окисления намного отрицательней такового пары $NADH/NAD^+$, то специальный механизм накопления энергии может быть включен в систему переноса

Таблица 4. Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых компонентов, имеющих отношение к дыхательной цепи

Редокс-пара	E'_0 , В	Редокс-пара	E'_0 , В
$OH^- + H^+ / H_2O$	1,35	Пируват/лактат	-0,19
$1/2 O_2 / H_2O$	0,82	Глютатион _o /глютатион _s	-0,23
Fe^{3+} / Fe^{2+}	0,77	Ацетоацетат/ β -оксибутират	-0,27
Феррицианид/ферроцианид	0,43	1,3-дифосфоглицерат/глицеральдегид-3-фосфат + P_i	-0,29
NO_3^- / NO_2^-	0,42	Липоат/дигидролипоат	-0,29
Цитохром c_o /цитохром c_s	0,25	$NAD^+ / NADH + H^+$	-0,32
Метгемоглобин/гемоглобин	0,17	$NADP^+ / NADPH + H^+$	-0,32
$CoQ / CoQH_2$	0,05	Пируват + CO_2 /малат	-0,33
Дегидроаскорбат/аскорбат	0,08	$H^+ / 1/2 H_2$	-0,42
Фумарат, сукцинат	0,03	O_2 / O_2^-	-0,45
Метиленовая синь (MC) _o / MC_s	0,01	α -Кетоглутарат/сукцинат + CO_2	-0,67
α -Кетоглутарат + $NH_4^+ /$ / глутамат	-0,14	Пируват/ацетат + CO_2	-0,70
Оксалоацетат/малат	-0,17		

Примечание. Приведены потенциалы полувосстановления (E'_0) при pH 7,0 во всех случаях, кроме цитохрома b_2 и CoQ , где он равен 7,4 (из Смита и соавт. [1431])

водорода еще до дыхательной цепи. Есть два важных примера такого рода механизма. Это дегидрогеназы кетокислот: α -кетоглутаровой и пировиноградной. В процессе α -кетоглутаратдегидрогеназной реакции энергия, освобождающаяся при переносе водорода с α -кетоглутарата (редокс-потенциал $-0,67$ В) на NAD^+ , используется, чтобы образовать GTP из GDP и P_i . Аналогичная реакция в случае пирувата (редокс-потенциал $-0,7$ В) также сопряжена с восстановлением NAD^+ , но освобождающаяся энергия используется для ацетилирования CoA посредством ацетильной группы, образующейся из пирувата.

Такого типа реакции относят к разряду процессов трансформации энергии на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование в случае α -кетоглутарата и ацетилирование в случае пирувата). Гликолитическая оксидоредукция — еще один пример субстратного фосфорилирования.

Во всех этих случаях механизм трансформации энергии сильно отличается от такового в фотосинтезе и дыхании. Он не требует мембран и может быть продемонстрирован в водном растворе соотвествующих субстратов, ферментов и кофакторов. Окислительный процесс приводит к синтезу высокоэнергетических соеди-

нений, образованных продуктом окисления субстрата и функциональной группой фермента или кофермента (см. обзор: [125]).

Если редокс-потенциал субстрата значительно ниже, чем у NAD, восстановительные эквиваленты переносятся на средний или конечный участок дыхательной цепи. Так окисляются сукцинат (редокс-потенциал $+0,03$ В) — один из субстратов цикла Кребса, а также ацил-СоА, субстрат первой оксидоредукции в системе β -окисления жирных кислот. Как сукцинат-, так и ацил-СоА-дегидрогеназа питают электронами дыхательную цепь на уровне комплекса bc_1 .

В очень редких случаях редокс-потенциал окисляемого субстрата более положителен, чем у СоQ. Тогда восстановительные эквиваленты входят в цепь на уровне цитохрома c , так что только цитохромоксидазный ΔH -генератор участвует в трансформации энергии. Примером такого рода может служить окисление аскорбиновой кислоты.

Редокс-потенциалы ряда субстратов и интермедиатов дыхательной цепи приведены в табл. 4.

3.4.3. NADH—СоQ-редуктаза

3.4.3.1. Белковый состав и редокс-центры

Проблема белкового состава NADH—СоQ-редуктазы до сих пор не решена. Этот комплекс (по номенклатуре Дэвида Грина, комплекс I [639]) может содержать до 26 полипептидов 17 различающихся по молекулярной массе типов, так что общая масса комплекса оказывается порядка 700—900 кДа [1154, 1234]. Однако комплекс удается разделить на фрагменты, содержащие несколько меньше полипептидов, но все редокс-группы, а именно FMN и около 20 атомов негемового железа (железосерные кластеры комплекса I, обозначаемые FeS_i).

Считается, что редокс-центры связаны с двумя фрагментами комплекса: флавопротеидом (FP), или NADH-дегидрогеназой, и железобелком (IP). Первый содержит FMN и некоторые из FeS -кластеров, в то время как в состав второго входят остальные FeS -кластеры [1234].

Фрагмент FP состоит из трех полипептидов в соотношении 1:1:1 (массы 51, 24 и 10 кДа). Он катализирует окисление NADH некоторыми искусственными акцепторами электронов, но не природным акцептором СоQ. Тяжелая субъединица связывает NADH. Она содержит FMN и четыре атома железа. Перенос водорода от NADH к FMN специфически тормозится реином (4,4-диоксиантрахион-2-карбоксилатом) [825].

Средняя субъединица, по-видимому, содержит двухжелезный FeS -кластер. Еще два FeS -кластера, связанных с большой субъ-

диницей FP, обозначают FeS_{1a} и FeS_{1b} . Их редокс-потенциалы соответственно $-0,37$ В и $-0,22$ В [1234].

В мембране FP недоступен для гидрофильных модификаторов белка. Следовательно, он должен быть прикрыт другими белковыми субъединицами или фосфолипидами. Это означает, что доступ NADH как гидрофильной молекулы к месту связывания должен быть специально организован (сходную проблему мы рассмотрим в разделе 5.1.1.8, когда будет обсуждаться взаимодействие H^+ —АТР-синтазы с ее гидрофильными субстратами).

Первичная структура средней субъединицы не имеет достаточно протяженных гидрофобных последовательностей, чтобы пересекать мембрану [203].

Фрагмент IP содержит 6 полипептидов (75, 49, 30, 18, 15 и 13 кДа) и около 12 атомов Fe. Некоторые из FeS -белков комплекса имеют тенденцию терять железо при очистке. Есть указания, что все FeS -кластеры IP содержат по четыре атома железа, т. е. всего число этих кластеров равно трем. Считается, что два из них ассоциированы с полипептидами 75 кДа и 49 кДа, а третий — с эквимолярным комплексом субъединиц 30 кДа и 13 кДа. Редокс-потенциалы всех FeS -кластеров в IP похожи (около $-0,24$ В). Они различаются лишь по сигналам ЭПР [1234]. Один из кластеров (FeS_3) локализован вблизи FMN, в то время как другой (FeS_4) удален от FMN [757]. Что касается третьего кластера, находящегося в IP (FeS_5), то остается неясным, действительно ли он является составной частью комплекса. Его количество обычно варьирует от 0,06 до 0,25 на один FMN в условиях, когда количество других кластеров превышает 0,4 (как правило, 0,8—1,0) [1597].

Субъединицу 75 кДа фрагмента IP удается пометить светочувствительным производным NAD^+ . Стало быть, она расположена вблизи тяжелой субъединицы фрагмента FP. Отдельные участки субъединиц 75 кДа и 49 кДа обращены в водную фазу. Оба полипептида пересекают мембрану.

Как FP, так и IP можно перевести в раствор хаотропными агентами. На долю FP и IP приходится 30% от общего белка комплекса I. Остаток не удается солиubilизировать. Он содержит Fe -кластер с редокс-потенциалом около $-0,02$ В (FeS_2), который предположительно играет роль восстановителя СоQ. Полагают, что между FeS_2 и СоQ локализовано место торможения комплекса ротеноном, пирицидином, барбитуратами и некоторыми аналогами СоQ.

По данным Сузуки и Кинга, в NADH—СоQ-редуктазном комплексе есть два различных центра связывания СоQ [1476]. Более подробные сведения о структуре комплекса I можно найти в обзорах [1154, 1232, 1234, 1597]. Согласно последним работам, выполненным на митохондриях человека [1373] и нейроспоры [759], в NADH—СоQ-редуктазе содержится не менее шести типов полипептидов, которые кодируются митохондриальным геномом и,

следовательно, синтезируются в митохондриях. Не менее одиннадцати других полипептидов кодируются в ядре и синтезируются в цитоплазме.

3.4.3.2. Доказательство $\Delta\bar{p}H$ -генерирующей способности NADH—CoQ-редуктазы

Предположение, что NADH—CoQ-редуктаза способна генерировать $\Delta\bar{p}H$, было высказано Митчелом [1046], исходя из наличия синтеза АТФ в этом месте дыхательной цепи. В частности, Шацем и Ракером было показано фосфорилирование, сопряженное с окислением NADH посредством CoQ_1 в субмитохондриальных пузырьках [1313]. В нашей группе было установлено, что окисление NADH фумаратом генерирует $\Delta\bar{p}H$ на мембране субмитохондриальных пузырьков [648].

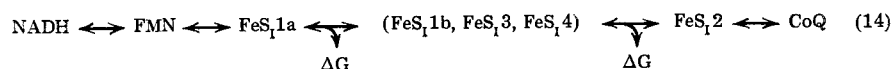
В NADH—CoQ-редуктазных протеолипосомах был показан транспорт протонов, сопряженный с окислением NADH [1235]. Если протеолипосомы содержали еще и H^+ —АТФ-синтазу, то окисление NADH сопровождалось синтезом АТФ [350, 1234, 1236].

Было описано также образование $\Delta\bar{p}H$ на участке между NADH и CoQ и предпринята попытка измерить стехиометрию H^+/e^- . В ранних работах [913, 1060] этот коэффициент оказался около 1. Однако более поздние исследователи приводят величину 2 [350, 582, 924, 1064, 1206, 1277, 1331, 1594].

В этой связи следует отметить, что прямое измерение величины H^+/e^- в митохондриях или бактериях — все еще чрезвычайно сложная задача. Дело в том, что и митохондрии, и бактерии располагают многими механизмами образования и использования $\Delta\bar{p}H$, а также возможностью шунтировать сопряженную дыхательную цепь реакциями свободного окисления. Субмитохондриальные и суббактериальные пузырьки располагают меньшим набором альтернативных возможностей, но их внутренний объем гораздо меньше, чем в интактных клетках или органеллах, и потому изменения рН среды, сопутствующие генерации $\Delta\bar{p}H$, сравнительно малы. Хорошей моделью могли бы быть протеолипосомы, но получение крупных протеолипосом с высоким протонным контролем по сей день является неразрешимой задачей.

3.4.3.3. Возможные механизмы генерации $\Delta\bar{p}H$

Приняв во внимание редокс-потенциалы переносчиков электронов и водорода, входящих в состав NADH—CoQ-редуктазы, мы могли бы расположить эти переносчики в виде следующей линейной последовательности:



Первые два этапа этой последовательности реакций, а также последний из них происходят без существенного изменения свободной энергии, так как редокс-потенциалы восстановителей и окислителей близки. Что касается двух других этапов, редокс-потенциал восстановителя оказывается на 0,15—0,22В более отрицательным, чем таковой окислителя. Поэтому именно эти два этапа могут участвовать в трансформации энергии.

Одна из возможностей состоит в том, что в NADH—CoQ-редуктазе чередуются переносчики атомов водорода и переносчики электронов (H/e^- -антипорт, или механизм редокс-петли). В таком случае FMN мог бы служить переносчиком атомов H, поскольку его восстановление до $FMNH_2$ состоит в присоединении двух электронов и двух протонов к изоаллоксазиновому ядру. FeS-протеиды обычно рассматривают как переносчики электронов. Однако некоторые из них располагают протон-акцепторными группировками, которые повышают свое сродство к ионам H^+ при восстановлении FeS-кластера. Именно такие свойства присущи $FeS_1 1a$ и $FeS_1 2$. Показано, что редокс-потенциал этих компонентов зависит от рН, сдвигаясь в положительную сторону на 60 мВ при закислении среды на единицу рН. Этот факт указывает, что названные переносчики, приняв один электрон, присоединяют один протон. В то же время прочие FeS-белки NADH—CoQ-редуктазы таким свойством не обладают [1597]. Поэтому все они должны рассматриваться как переносчики электронов, а не атомов водорода.

Приняв во внимание эти обстоятельства, можно представить себе образующую $\Delta\bar{p}H$ редокс-петлю, показанную на рис. 42, а.

Согласно схеме, $FMNH_2$ и $FeS_1 1a$ катализируют трансмембранный перенос атомов водорода, направленный из матрикса (на рис. 42 сверху) к внешней (нижней) поверхности внутренней митохондриальной мембраны. Вблизи внешней поверхности $FeS_1 1a \cdot H$ окисляется каким-либо из FeS-протеидов — переносчиков электронов, например $FeS_1 1b$. В результате образуется протонированная форма окисленного $FeS_1 1a$, которая освобождает H^+ , так как сродство этого FeS-белка к протону при окислении уменьшается.

Выделившийся протон оказывается в ближайшей водной фазе, т. е. снаружи внутренней мембраны (в межмембранном пространстве митохондрии). $FeS_1 1b$ переносит электроны к внутренней поверхности мембраны. В этом процессе могли бы участвовать также $FeS_1 3$ и $FeS_1 4$. Предполагается далее, что переносчик атомов водорода $FeS_1 2$ принимает электрон, скажем, от $FeS_1 4$ и H^+ из матрикса, превращаясь в $FeS_1 2 \cdot H$. Последний восстанавливает CoQ.

Существенным результатом всех этих процессов оказывается перенос двух протонов из матрикса в межмембранное пространство.

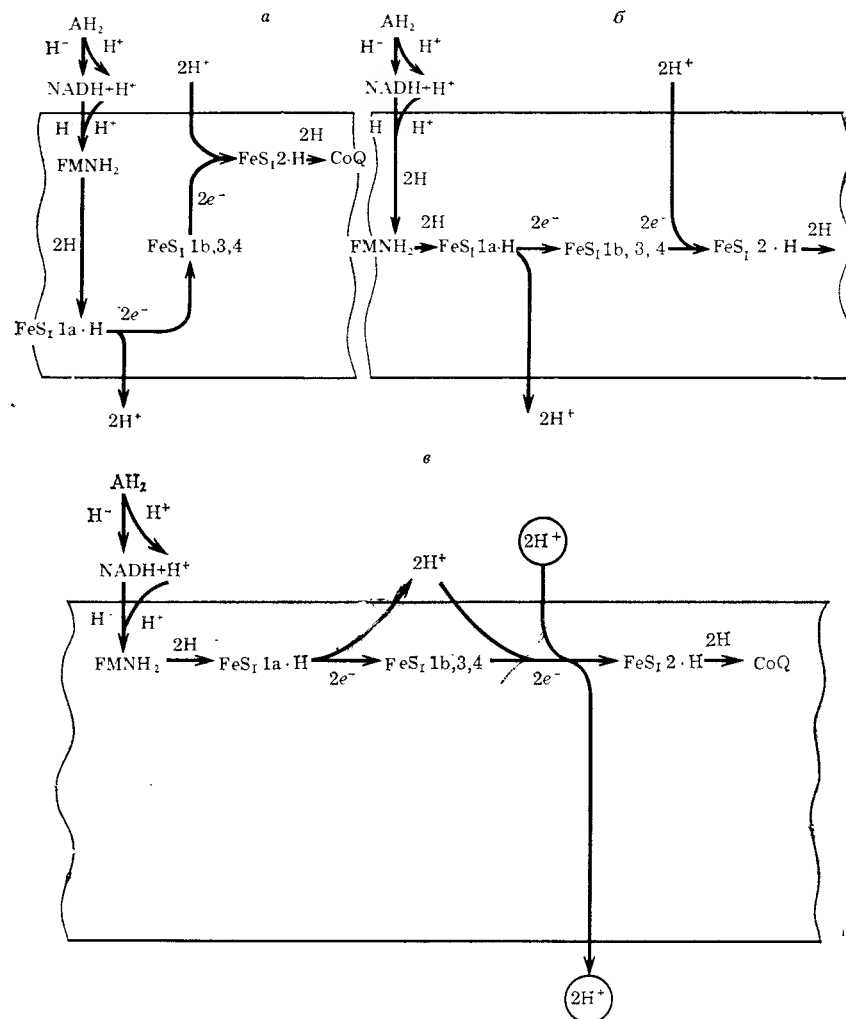
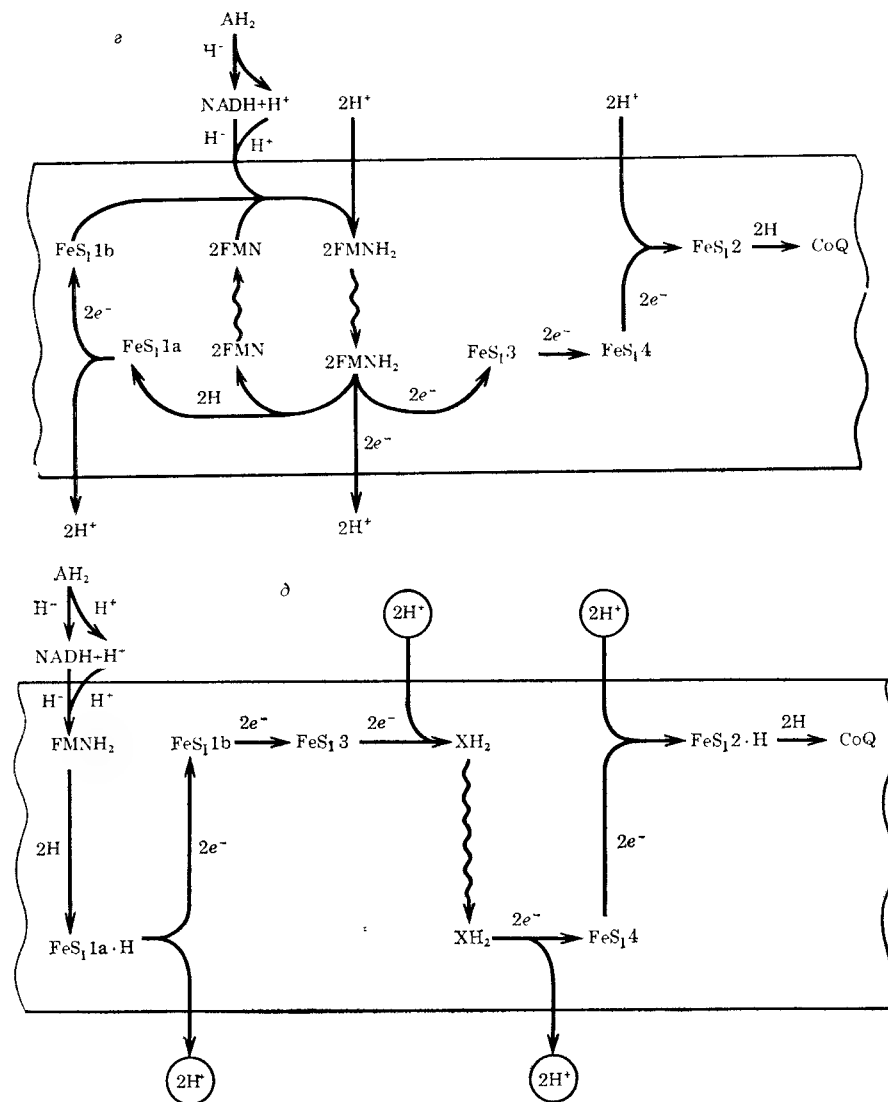


Рис. 42. Возможные варианты механизма,¹ обеспечивающего генерацию ΔpH митохондриальной NADH—CoQ-редуктазой

a — одиночная редокс-петля; *б* и *в* — H^+ ; *г* — флавиновый цикл; *д* — две последовательные редокс-петли (объяснения в тексте)

Тот же самый результат может быть достигнут и без транс-мембранного переноса электронов, если в мембране имеются входные и выходные H^+ -проводящие пути, связывающие FeS_{1a} (FeS_{12}) соответственно с межмембранным пространством и матриксом. Такой вариант NADH—CoQ-редуктазы показан на рис. 42, *б*. Этот гипотетический механизм основан на тех же двух



принципах, что и схема *a*, а именно: 1) связывание и освобождение протона при восстановлении и окислении переносчика водорода и 2) чередование переносчиков водорода и электронов в редокс-цепи.

Оба эти принципа оказываются ненужными в рамках схемы, изображенной на рис. 42, *в*. Здесь предполагается, что перенос ионов H^+ сопряжен с одной из экзергонических реакций, катализируемых комплексом I, например, с окислением FeS_{14} по-

средством FeS_12 . Такой H^+ -насос мог бы быть организован наподобие бактериородопсина, где выделяющаяся энергия используется для изменения положения и pK какой-то протолитической группы (см. ниже раздел 3.5.6). Например, окисление FeS_14 посредством FeS_12 могло бы вызывать конформационное изменение в белковой части одного из этих переносчиков, сопровождающееся движением протолитической группы от входного протонпроводящего к выходному пути и снижением сродства данной группы к протону.

Недостатком всех этих схем является то обстоятельство, что они не объясняют, почему $NADH-CoQ$ -редуктаза содержит так много редокс-центров. Например, на рис. 42, а и б выглядят лишними компоненты FeS_13 и FeS_14 , а схема на рис. в вообще могла бы обслуживаться всего какими-либо двумя редокс-центрами.

Схема на рис. 42, г свободна от этого недостатка. В ней предполагается, что $NADH-CoQ$ -редуктазный $\Delta\bar{p}H$ -генератор устроен по принципу Q-цикла с тем основным отличием, что роль убинона играет FMN. Эта идея в общей форме была высказана Хинклем [727]. Недавно в нашей группе [133] и независимо Рэйганом [1233] были рассмотрены ее конкретные варианты. Согласно нашей гипотезе флавинового (или F) цикла, восстановление FMN, подобно восстановлению CoQ в Q-цикле, может обеспечиваться двумя различными донорами восстановительных эквивалентов: $NADH$ и FeS_11b . Процесс сопровождается присоединением ионов H^+ так, чтобы в результате образовался $FMNH_2$. Эти ионы H^+ черпаются из матрикса. Далее, согласно схеме, $FMNH_2$ транслоцируется в направлении внешней стороны мембраны, а именно в ту ее область, где локализованы центры FeS_11a и FeS_13 . Здесь происходит восстановление обоих центров и окисление $FMNH_2$. Электроны с $FeS_11a \cdot H$ переносятся на FeS_11b , а протоны освобождаются в воду на внешней стороне мембраны. Восстановленный FeS_13 окисляется посредством FeS_14 и затем FeS_12 , локализованным по другую сторону гидрофобного барьера. Надо подчеркнуть, что эффективность описанного выше флавинового цикла оказывается вдвое большей, чем линейных схем, показанных на рис. 42, а—в (на каждую молекулу утилизированного субстрата через мембрану переносится 4 H^+).

Схема флавинового цикла согласуется с такими наблюдениями, как наличие двух молекул FMN на одну функциональную единицу $NADH-CoQ$ -редуктазы (вероятно, за счет димеризации комплекса I) [480], тесный контакт FeS_13 и FMN [757] и некоторые другие. Все шесть типов редокс-центров, описанных в $NADH-CoQ$ -редуктазе, задействованы в цикле.

В хорошем соответствии со схемой находятся редокс-потенциалы компонентов комплекса I. Разность редокс-потенциалов между парами $NADH/NAD^+$ и $CoQH_2/CoQ$ составляет около 0,38 В. Эта величина, по-видимому, достаточна для энергообеспечения синтеза двух молекул АТФ на каждый окисленный $NADH$.

Она примерно вдвое больше, чем изменение редокс-потенциала на следующем энергопреобразующем этапе цепи, т. е. между парой $CoQH_2/CoQ$ и c^{2+}/c^{3+} . Забегая вперед, отметим, что на каждый электрон, перенесенный $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазой, через мембрану транспортируется один заряд, а не два, как это предполагается для $NADH-CoQ$ -редуктазы и цитохромоксидазы (см. ниже разделы 3.4.4.2 и 3.4.5.4).

Редокс-потенциал FeS_11a на 0,15В отрицательнее, чем таковой FeS_1-1b . На 0,22В отличаются редокс-потенциалы FeS_14 и FeS_12 (последний более положительный). Поэтому перенос электронов от FeS_11a к FeS_11b и от FeS_14 к FeS_12 сопровождается выделением энергии, а значит, может осуществляться против сил трансмембранного электрического поля, т. е. происходит поперек мембраны. В то же время, как уже отмечалось выше, оксидоредукции между $NADH$ и FMN, FMN и FeS_11a , FeS_13 и FeS_14 , FeS_12 и CoQ протекают без существенных изменений редокс-потенциала. На схеме все эти реакции происходят без трансмембранного перемещения зарядов.

Схема флавинового цикла — не единственный возможный механизм, при котором $NADH-CoQ$ -редуктаза характеризуется отношением $H^+/2e^- = 4$. Альтернативная линейная схема, включающая две редокс-петли, показана на рис. 42, д. Однако в этом случае набор переносчиков атомов H (FMN, FeS_11a и FeS_12) должен быть дополнен еще одним, пока неизвестным компонентом (X) с редокс-потенциалом где-то между —0,2В и —0,25В. Наличие неизвестных редокс-центров в $NADH-CoQ$ -редуктазе на сегодня трудно исключить из-за недостаточности сведений о составе этого комплекса. Что касается схемы флавинового цикла, она не нуждается в дополнительных редокс-центрах.

Кроме того, можно предположить, что в $NADH-CoQ$ -редуктазе имеется две H^+ -помпы: одна между FeS_14 и FeS_12 (см. рис. 42, е) и другая между FeS_11a и FeS_11b . В таком случае отпадает необходимость в дополнительном переносчике водорода.

Чтобы сделать аргументированный выбор между рассматриваемыми возможностями, необходимы дальнейшие исследования. Особенно перспективными представляются измерения энергозависимых изменений редокс-потенциалов FeS -центров в $NADH-CoQ$ -редуктазе (см.: [1597]).

Сложность строения, присущая митохондриальной $NADH-CoQ$ -редуктазе, не есть непереносимое свойство этого сегмента дыхательной цепи. Так, есть мнение, что $NADH-CoQ$ -редуктазный $\Delta\bar{p}H$ -генератор *E. coli* состоит из одного-единственного полипептида, несущего FAD вместо FMN. Фермент устойчив к ротенону [775]. При анаэробии или в аэробных условиях, но при нехватке сульфата в среде роста механизм окисления $NADH$ утрачивает способность генерировать $\Delta\bar{p}H$. При этом неясно, то ли модифицируется исходная энергопреобразующая $NADH-$

СоQ-редуктаза, то ли возникает шунт свободного окисления в обход комплекса I [667].

В то же время NADH—СоQ-редуктаза из *Paracoccus denitrificans* чувствительна к ротенону [602, 1372]. Она содержит FeS-центры, которые по сигналам ЭПР напоминают таковые в митохондриях [156]. В состав фермента входит несколько полипептидов, имеющих общие антигенные детерминанты с митохондриальным комплексом I [603, 1233]. Есть указания, что отношение $H^+/2e^-$ для фермента из *P. denitrificans* ближе к четырем, чем к двум [1461].

Заманчиво было бы предположить, что NADH—СоQ-редуктазный сегмент цепи может быть организован тремя различными способами: 1) свободное окисление без какой бы то ни было генерации $\Delta\bar{p}H$ (анаэробные или выращенные при недостатке сульфата клетки *E. coli*), 2) сопряженное окисление с отношением $H^+/2e^-$, равным двум, и линейной последовательностью реакций (аэробные клетки *E. coli* без лимита по сульфату) и 3) сопряженное окисление с отношением $H^+/2e^-$, равным четырем, описываемое схемой флавинового цикла (митохондрии и *P. denitrificans*). В рамках такой концепции более сложное устройство митохондриальной NADH—СоQ-редуктазы необходимо для повышения ее эффективности.

3.4.4. СоQH₂—цитохром *c*-редуктаза

NADH—СоQ-редуктаза служит восстановителем СоQ, который, в свою очередь, передает электроны на сегмент дыхательной цепи, называемый СоQH₂—цитохром *c*-редуктазой (синонимы: комплекс *bc*₁ и комплекс III).

Очищенный комплекс *bc*₁ был реконструирован с фосфолипидами. Полученные протеолипосомы генерировали $\Delta\bar{p}H$ при переносе электронов от некоторых аналогов убигидрохинона на цитохром *c* [655, 927]. Если в те же протеолипосомы была включена H^+ —АТР-синтаза, то наблюдался сопряженный синтез АТР [1225]. Эти факты и целый ряд наблюдений, сделанных при изучении митохондрий и их фрагментов, показывают, что СоQH₂—цитохром *c*-редуктаза функционирует в качестве $\Delta\bar{p}H$ -генератора.

3.4.4.1. Структурные аспекты

Комплекс III содержит четыре редокс-центра: гемы *b*_L и *b*_H, связанные с цитохромом *b*, негемовый железосерный кластер (FeS_{III}), включенный в соответствующий апопротеид, и гем *c*, присоединенный к апопротеиду цитохрома *c*₁.

Полипептидный состав комплекса из митохондрий бычьего сердца приведен в табл. 5. В целом подобная картина описана также для комплекса из митохондрий дрожжей и нейроспоры,

Таблица 5. Субъединицы комплекса *bc*₁ из митохондрий сердца быка

Субъединица	Молекулярная масса, кДа	Название	Функция	Литературный источник
I	49,5	Сердцевинный белок I	Неизвестна	[979]
II	47,0	Сердцевинный белок II	»	[979]
III	44,0	Цитохром <i>b</i>	Редокс	[1301]
IV	28,0	Цитохром <i>c</i> ₁	»	[1564]
V	21,5	FeS _{III} -белок	»	[682]
VI	13,5	Q _{III} -белок	Связывание СоQ	[1311]
VII	9,5	—	Неизвестна	[283, 1311]
VIII	9,0	—	Связывание цитохрома <i>c</i> ₁ ?	[1311]
IX	8,0	—	Связывание субъединицы VI?	[1311]
X	7,0	—	Связывание цитохрома <i>c</i> ₁ ?	[1311]
XI	6,5	—	Связывание FeS _{III} -белка	[1311]

хотя обнаруживаются и некоторые отличия в молекулярных массах субъединиц. Сравнение со следующим дыхательным комплексом — цитохромоксидазой — показало, что комплексы не содержат ни одной общей субъединицы [979].

Наряду с переносчиками восстановительных эквивалентов в состав СоQH₂—цитохром *c*-редуктазы входят, по-видимому, восемь полипептидов, лишенных простетических групп. Один из них (субъединица VI) связывает СоQ. Она состоит из 110 аминокислотных остатков и содержит большое количество (около 50%) α -спиральных участков [1565].

Есть указания, что субъединицы VIII и X образуют субкомплекс с цитохромом *c*₁. Одна из них облегчает связывание цитохрома *c*₁ с цитохромом *c*. В этой субъединице 27% всех аминокислотных остатков составляют глутамат и глутамин, причем вблизи N-конца имеется кластер из восьми следующих друг за другом глутаматов [1566]. Можно предположить, что именно этот отрицательно заряженный участок белка взаимодействует с цитохромом *c*, который содержит много положительно заряженных аминокислотных остатков.

Как полагают Шаггер и соавт. [1311], самая мелкая субъединица (XI) участвует в связывании FeS_{III}-белка.

Что касается других полипептидов, не имеющих редокс-центров, их функции остаются неясными. Может быть, некоторые

из них нужны для переноса протонов, другие — для организации целостной структуры комплекса bc_1 . Последнюю функцию приписывали одно время наиболее крупным субъединицам I и II, названным по этой причине сердцевинными белками комплекса. Однако не так давно было обнаружено, что при биогенезе митохондрий белок I включается в комплекс bc_1 намного позднее, чем цитохром [1382]. Этот факт свидетельствует против гипотезы о ведущей роли сердцевинных белков в самосборке $CoQH_2$ —цитохром c -редуктазы. Сказанное не означает, что сердцевинные белки не нужны для этого фермента. Их удаление ведет к потере ферментативной активности, а последующая добавка возвращает ее [947].

Рассмотрим более подробно белки, снабженные редокс-группами, начав с цитохрома b .

Долгое время предполагалось, что два гема типа b связаны с разными апобелками массой около 30 кДа каждый. Ошибочность этого положения стала очевидной после выделения гена, кодирующего митохондриальный цитохром b . Оказалось, что аминокислотная последовательность, записанная в гене, соответствует белку массой около 45 кДа. Поскольку нет никаких указаний, что цитохром b синтезируется в виде более длинного предшественника, этот факт заставил пересмотреть старый взгляд на соотношение гем/белок в цитохроме b . (Здесь уместно отметить, что апобелок цитохрома b — единственный полипептид комплекса bc_1 , кодируемый митохондриальной ДНК.) По современным представлениям, в $CoQH$ —цитохром c -редуктазе есть только один цитохром b , который связывает оба гема: b_h и b_l (см. обзор: [1301]).

Было найдено, что плоскости гемов b ориентированы перпендикулярно поверхности мембраны. Возможная модель связывания гемов с апобелком цитохрома b была предложена Сарасте [1301]. Автор сравнил первичные структуры митохондриальных цитохромов b из разных источников (животных, грибов, растений), а также хлоропластного цитохрома b_6 . На рис. 43 показана схема упаковки цитохрома b в мембране, учитывающая чередование гидрофобных и гидрофильных последовательностей в апобелке. По Сарасте, белок девять раз пересекает мембрану. В рамках этой модели наиболее вероятно, что оба гема локализованы между второй и пятой α -спиральными колоннами. Здесь каждый гем может быть связан с белком по крайней мере тремя связями. Две из них образуются имидазольными группами белковых гистидинов и железом гема, а третья — положительно заряженной группой аргинина или лизина белка и отрицательно заряженной пропionateй группой гема. (Схема расположения гемов b была приведена выше на рис. 39, описывающем хлоропластный цитохром b_6 , который гомологичен митохондриальному цитохрому b .) Все перечисленные аминокислоты инвариантны у шести исследованных цитохромов b . По данным спектроскопии цитохромов b

и модельных соединений именно гистидины служат аксиальными лигандами гема.

Расстояние между центрами гемов в рассматриваемой модели оценивается в 2 нм, что согласуется с данными биоэнергетических опытов. Однако следует иметь в виду, что цитохром b еще недостаточно исследован, чтобы принять рассматриваемую схему как экспериментально доказанную. Так, «девятиколонная модель» на рис. 43, a не учитывает взаимодействия цитохрома b с другими компонентами комплекса bc_1 , которые могли бы образовать, например, гидрофобный чехол вокруг некоторых из гидрофильных участков цитохрома b , изменив тем самым расположение отдельных сегментов полипептидной цепи относительно мембраны. Поэтому картина, изображенная на рис. 43, a , должна рассматриваться как одна из возможных рабочих гипотез.

FeS_{III} — белок (другие названия: фактор Слейтера; фактор, чувствительный к британскому антильиозиту (БАЛ), фактор окисления, белок Риске) содержит один двухжелезный FeS -кластер.

Первичная структура апобелка была недавно выяснена Харнишем и соавт. [682], изучавшими нуклеотидную последовательность митохондриальной ДНК нейроспоры. Полипептид FeS_{III} массой 21,5 кДа состоит из 199 аминокислот (рис. 44, a). Он имеет сравнительно небольшую N-концевую гидрофильную часть (29 остатков), гидрофобную часть из 25 остатков (α -спиральная колонна?), за которой следует довольно гидрофильный домен (145 аминокислот).

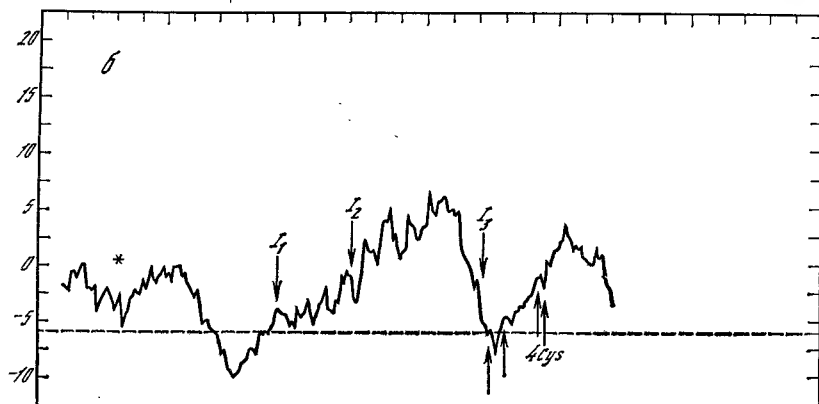
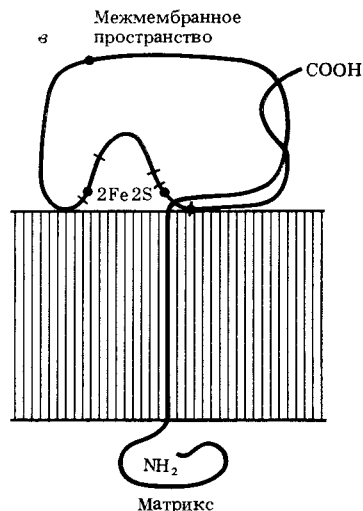
Белок, как известно, синтезируется в цитоплазме в виде более длинного предшественника, затем переносится в митохондрии и там укорачивается на 32 аминокислоты. Среди этих дополнительных аминокислот оказалось четыре положительно заряженных (аргинины), ни одной отрицательно заряженной и 11 аланинов, некоторые из которых следуют один за другим.

FeS_{III} -кластер образован двумя ионами железа, двумя ионами сульфида (S^{2-}) и четырьмя цистеиновыми остатками. Поскольку в белке всего четыре цистеина (в положениях 142, 147, 161 и 163 от N-конца зрелого полипептида), то представляется очевидным, с какой именно частью белка связан железосерный центр [682].

К сожалению, трехмерная структура FeS_{III} -белка неизвестна. Однако профиль полярности (рис. 44, b) и некоторые другие косвенные данные [932] указывают на реалистичность модели, приведенной на рис. 44, $в$. По этой схеме короткий N-концевой гидрофильный участок высунут в матрикс, а следующий за ним единственный гидрофобный тяж пронизывает мембрану. Что касается крупного C-концевого домена, то он обращен в межмембранное пространство. В этом домене есть более гидрофобная часть, где локализован FeS -кластер. Вблизи кластера находятся три остатка гистидина. Они могли бы участвовать в переносе протонов, один

α 1- 60 CGAAACGTCGCAACCAAGCTCCGCCAGAAAAACCTAGTCCTGATTTTGCCCTCGTCG
 61- 120 TCTCGACCGCATACCGACCGCTCAATTCGGTCTTCGGAACACGGCCACGTCACCGTC
 121- 180 CTCGCCGACCTCGGAAGACAGAACCTCGTCGATCTCCCGCTCTCGCAACCCCGCTC
 181- 240 CTCGGCTCCGACCTCTGTCCACGGCAGTAATTTACCGACACATGGCCGCCGCTCTCGAT
 241- 300 VAL SER ARG ALA ALA MET ARG ALA ALA ALA PRO ALA ARG ALA VAL ARG ALA LEU THR
 301- 360 THR SER THR ALA LEU GLN GLY SER SER THR PHE GLU SER PRO PHE LYS GLY GLU
 361- 420 SER LYS ALA ALA LYS VAL PRO ASP PHE GLY LYS TYR MET SER LYS ALA PRO PRO SER THR
 421- 480 ASN MET LEU PHE SER TYR PHE MET VAL GLY THR MET GLY ALA ILE THR ALA ALA GLY ALA
 481- 540 LYS SER THR ILE GLN G
 541- 600 TCCCTCAGGTTGGGGAAACAAAGAGGGTGGCATAGGACAGATGGGTTGGGGTCAAGGGAT
 601- 660 TCGACAAAGGGGTTCTGTATGGTGGGGCGAGCTGTACGGTTCGGTTCATCGATCAC
 661- 720 CAATTTGGGACCACTATGACAACTTTCGATATCGGGCGGATATGGTTGGACCTTGGGGC
 721- 780 GATGTTGAAGCATGGATACATCGGGAAATGCCATCTTGCACATGCACCCACGACACCC
 781- 840 AAGAACTAAGACAGCTGACGAGGGCGACCGTGTATACAGAGTTCCTCAAGAACATGTCTG
 841- 900 ALA SER ALA ASP VAL LEU ALA MET ALA LYS VAL GLU VAL ASP LEU ASN ALA ILE PRO GLU
 901- 960 GLY LYS ASN
 961- 1020 GGGTATATCGATTCCCGACCAAGATCAAACTATGATCGAATGCTCACCCTCGCTTTTC
 1021- 1080 VAL ILE ILE LYS TRP ARG GLY LYS PRO VAL PHE ILE ARG HIS ARG THR P
 1081- 1140 RO ALA GLU ILE GLU ALA ASN LYS VAL ASN VAL ALA THR LEU ARG ASP PRO GLU THR A
 1141- 1200 SP ALA ASP ARG VAL LYS LYS PRO GLU TRP LEU VAL MET LEU G
 1201- 1260 CTCCTTGGGATCCGAACAGACGAGGATAGCATTTTGGATGCTCAGATCTGGATACA
 1261- 1320 CGACCGATGTGGGGAGACTGACATTTGGTGTGTGAACAAAGAGGGCTCGCACCCACTTG
 1321- 1380 GLY CYS VAL PRO ILE GLY GLU ALA GLY ASP TYR GLY GLY TRP PHE CYS PRO CYS HIS GLY
 1381- 1440 SER HIS TYR ASP ILE SER GLY ARG ILE ARG LYS GLY PRO ALA PRO LEU ASN LEU GLU ILE
 1441- 1500 PRO LEU TYR GLU PHE PRO GLU GLY LYS LEU VAL ILE GLY ***
 1501- 1560 AAACCTTCGGATTGAACAAACAGACACAAATTTTAAACCAACCTACTAGGGAAATCCTCT
 1561- 1620 CGATATTCCTTGTCCACTTTTTCCTTTCCTTGTCTGCCGAGACGATGACAGGGAGAA
 1621- 1680 TTGTATTAGTACGGGGGTATTGCGACAAAGGGCTTGAGTGGAGCAIGTCATAGACCATA
 1681- 1740 AAGCGGGATTCTTGTTCCTGCTTCTGACGGCTTCTGTACGACTATCCTATAGACA
 1741- 1790 GAAGACACACATACCGCATACACACAGCAAAATCAGGTGTACGGTCTCGATC

961-1020 GGGTATATCGATTCCCGACCAAGATCAAACTATGATCGAATGCTCACCCTCGCTTTTC
 1021-1080 VAL ILE ILE LYS TRP ARG GLY LYS PRO VAL PHE ILE ARG HIS ARG THR P
 1081-1140 RO ALA GLU ILE GLU ALA ASN LYS VAL ASN VAL ALA THR LEU ARG ASP PRO GLU THR A
 1141-1200 SP ALA ASP ARG VAL LYS LYS PRO GLU TRP LEU VAL MET LEU G
 1201-1260 CTCCTTGGGATCCGAACAGACGAGGATAGCATTTTGGATGCTCAGATCTGGATACA
 1261-1320 CGACCGATGTGGGGAGACTGACATTTGGTGTGTGAACAAAGAGGGCTCGCACCCACTTG
 1321-1380 GLY CYS VAL PRO ILE GLY GLU ALA GLY ASP TYR GLY GLY TRP PHE CYS PRO CYS HIS GLY
 1381-1440 SER HIS TYR ASP ILE SER GLY ARG ILE ARG LYS GLY PRO ALA PRO LEU ASN LEU GLU ILE
 1441-1500 PRO LEU TYR GLU PHE PRO GLU GLY LYS LEU VAL ILE GLY ***
 1501-1560 AAACCTTCGGATTGAACAAACAGACACAAATTTTAAACCAACCTACTAGGGAAATCCTCT
 1561-1620 CGATATTCCTTGTCCACTTTTTCCTTTCCTTGTCTGCCGAGACGATGACAGGGAGAA
 1621-1680 TTGTATTAGTACGGGGGTATTGCGACAAAGGGCTTGAGTGGAGCAIGTCATAGACCATA
 1681-1740 AAGCGGGATTCTTGTTCCTGCTTCTGACGGCTTCTGTACGACTATCCTATAGACA
 1741-1790 GAAGACACACATACCGCATACACACAGCAAAATCAGGTGTACGGTCTCGATC

Рис. 44. Структура FeS_{III} -белка

а — последовательность аминокислот белка-предшественника; б — профиль его полярности. Зрелый белок начинается с 33-й аминокислоты, отмеченной звездочкой. Стрелками указаны положения цистеинов (Cys) и интронов (I); в — предсказанное расположение зрелого белка в митохондриальной мембране. Положения четырех гистидинов указаны черными точками (по: Харниш и соавт. [682])

и которых выделяется при связывании CoQH_2 с FeS_{III} -белком, задругой — при переносе электрона с CoQH^+ на негемовое железо [682].

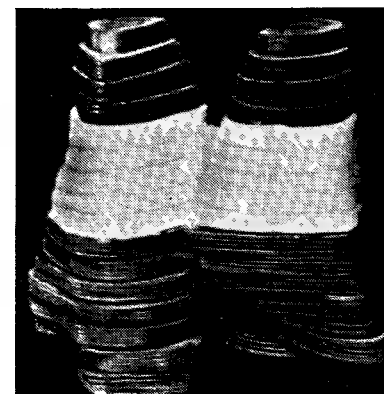
Цитохром c_1 представляет собой полипептид, состоящий из 241 аминокислоты. Его первичная структура была расшифрована в группе Кинга [1564].

Цитохром c_1 содержит один гем типа с, ковалентно связанный с остатками цистеина в положениях 37 и 40, т. е. вблизи N-конца [1564]. Вместе с некоторыми другими субъединицами комплекса III цитохром c_1 образует место связывания цитохрома с. Последний, как было показано, связывается с комплексом bc_1 тем же своим участком, который затем взаимодействует с цитохромоксидазой. По-видимому, цитохром с, приняв электрон от цитохрома c_1 , покидает свое место на комплексе bc_1 или по крайней мере «поворачивается к нему спиной», чтобы «стать лицом» к цитохромоксидазе.

Твердо установлено, что место связывания цитохрома c_1 с цитохромом с локализовано на внешней поверхности внутренней

Рис. 45. Пространственная модель димера комплекса bc_1 из митохондрий

Темным обозначены участки, выступающие из мембраны в воду (сверху — в межмембранное пространство, снизу — в матрикс). Толщина срезов 1 нм (по: Леонард и соавт. [926])



митохондриальной мембраны (у бактерий — цитоплазматической мембраны) (см. обзор: [1096]). Белок заякорен в мембране единственным гидрофобным сегментом, локализованным вблизи С-конца. Этот сегмент может быть отщеплен протеазой.

Расстояние гема от поверхности глобулы изолированного цитохрома c_1 оценивается в 1,0 нм. То же расстояние для FeS -кластера в FeS_{III} -белке равно 1,9 нм (см. обзор: [1597]).

Получена определенная информация о расположении в мембране комплекса bc_1 как целого. Так, Леонард и соавт. [926] использовали электронно-микроскопический подход, ранее разработанный Хендерсоном и Ануином применительно к бактериородопсину (см. раздел 3.5.2). Было обнаружено, что комплексы bc_1 образуют димеры, общий вид которых показан на рис. 45. Каждый мономер длиной 15 нм ориентирован перпендикулярно плоскости мембраны, причем большая его часть (7 нм) выступает из мембраны в матрикс, а меньшая (3 нм) — в межмембранное пространство. Средняя часть (5 нм) погружена в толщу мембраны. Именно в этой области контактируют между собой два мономера, образующие димер.

Существует наблюдение, свидетельствующее о том, что комплекс bc_1 может быть устроен существенно проще. У *R. denitrificans* тот же самый фермент составлен всего из трех субъединиц: 62 кДа (цитохром c_1), 39 кДа (двугемовый цитохром b) и 20 кДа (FeS -белок). Комплекс катализирует всю последовательность реакций Q-цикла и генерирует $\Delta\mu\text{H}$. CoQ — цитохром с-редуктаза этой бактерии оказалась чувствительной ко всему набору специфических ингибиторов митохондриального Q-цикла [1523, 1638].

3.4.4.2. Функциональная модель

Схема функционирования митохондриальной CoQH_2 -цитохром с-редуктазы была приведена выше (рис. 41, а). Есть ряд свидетельств, подтверждающих циклический перенос восстановительных эквивалентов, постулированный на схеме. Среди них — отве-

ты системы на добавление специфических ингибиторов. Как сообщили в 1962 г. Дьюэл и Торн [511], необходимы сразу два ингибитора (БАЛ и антимицин А), чтобы блокировать восстановление митохондриального цитохрома b . Позднее было показано, что этот эффект обусловлен существованием двух различных путей переноса электронов к цитохрому b . Один из них, чувствительный к антимицину, а также к HQNO и фуникулосину, обусловлен взаимодействием между CoQ и гемом b_h . По данным Константинова [892], этот путь локализован вблизи внутренней (т. е. обращенной в матрикс) стороны митохондриальной мембраны (см. ниже).

Другой путь пролегает где-то в середине мембраны. Он ведет к гемму b_l и требует FeS_{III}. Путь тормозится посредством БАЛ, который разрушает FeS_{III}-кластер в присутствии кислорода. Такой же эффект имеет экстракция FeS_{III}-белка из мембраны. Кроме БАЛ существует еще ряд ингибиторов, действующих на этот путь. Среди них миксотиазол, муцидин и 5-*n*-ундецил-6-окси-2,7-диоксобензотиазол (см. обзор: [1597]).

ДЦКД, ингибитор протонного канала в H⁺-АТФ-синтазе и ряда других генераторов и потребителей ДРН, вызывает образование сшивки между FeS_{III}-белком и одной из мелких субъединиц комплекса bc_1 [1090, 955, 282]. Такой эффект приводит к торможению переноса электронов [295, 1090, 1250]. Отмечалось также, что цитохром b также может модифицироваться посредством ДЦКД. При этом изменяется спектр этого цитохрома [233]. Ингибиторный эффект ионов Zn²⁺ на bc_1 -комплекс, вероятно, направлен на FeS_{III} [125].

Редокс-потенциалы переносчиков электронов, присутствующих в CoQ — цитохром c -редуктазе, хорошо согласуются со схемой Q-цикла. Для гемов b_l и b_h они равны соответственно $-0,04$ В и $+0,04$ В, для FeS_{III} — $+0,28$ В, для цитохромов c_1 и c — соответственно $+0,22$ В и $+0,25$ В. Важно, что редокс-потенциал гема b_h заметно положительнее, чем гема b_l , так что перенос электронов с b_l на b_h должен сопровождаться освобождением энергии. Эта энергия расходуется на создание $\Delta\psi$, так как оксидоредукция $b_h \rightarrow b_l$ направлена поперек мембраны. Соответственно потенциал CoQ отрицательнее, чем FeS_{III}-белка. Энергия, выделяющаяся на этой стадии, также расходуется на создание $\Delta\psi$, но уже за счет переноса протонов.

В то же время перенос электронов от FeS_{III} к цитохрому c_1 и далее к c вдоль мембраны происходит без существенных изменений редокс-потенциала и, следовательно, без выделения энергии. Редокс-потенциалы FeS_{III} и цитохромов типа c при физиологических pH не зависят от кислотности среды, так что эти компоненты служат переносчиками электронов, а не атомов водорода.

Считается, что переносчиком атомов водорода в Q-цикле является CoQ, как это было постулировано Митчелом, когда он выдвинул схему Q-цикла [1053]. Именно такая возможность показана

на рис. 41, а. Однако эта схема не объясняет тот факт, что редокс-потенциалы гемов b_h и b_l характерным образом зависят от pH, как если бы они переносили атомы H, а не электроны [1597].

Другая нерешенная проблема — механизм переноса H⁺. Как было показано в нашей группе А. А. Константиновым и его коллегами [874], а также Гофером и Гутманом [628], редокс-потенциал гема b_l отвечает только на 40% общей $\Delta\psi$ на мембране митохондрий. Этот факт согласуется с положением, что расстояние между центрами гемов в цитохроме b равно 2 нм при общей толщине мембраны около 5 нм (см. выше). Сказанное означает, что трансмембранный перенос заряда, катализируемый комплексом bc_1 , складывается из переноса электрона от гема b_l к гемму b_h (40% толщины мембраны) и переноса H⁺, освобождающегося при окислении CoQH₂ посредством FeS_{III}, через остальную (60%) часть мембраны (см. рис. 41, а). Компонентами этого протонпроводящего пути могли бы быть гистидины FeS_{III}-белка (см. предыдущий раздел). Обсуждается также участие апопротеида цитохрома b , сердцевинных белков и малых субъединиц комплекса III.

На рис. 41, а гем b_h расположен вблизи поверхности мембраны, смотрящей в матрикс, а гем b_l — в середине мембраны. Такая локализация гемов b была постулирована Митчелом [1053] и экспериментально доказана в нашей лаборатории А. А. Константиновым [74, 891]. Было показано, что водорастворимый непроницающий редокс-медиатор Ru(NH₃)₆²⁺ (гексааминорутений) восстанавливает гем b_h при добавлении к вывернутым субмитохондриальным пузырькам с такой же скоростью, как в случае выделенного комплекса bc_1 . Такого восстановления не наблюдалось, когда вместо субмитохондриальных пузырьков брали митохондрии или протеолипосомы с той же ориентацией комплекса bc_1 , что в митохондриях. В этих случаях для восстановления гема b_h требовался проникающий медиатор ФМС.

Выяснение положения гема b_h позволило также локализовать и гем b_l . Судя по описанному выше ответу редокс-потенциала b_l на трансмембранную $\Delta\psi$, этот гем должен быть примерно на полпути к противоположной поверхности мембраны.

Одно из требований схемы Q-цикла, показанной на рис. 41, а, — это участие стабильной формы аниона семихинона (CoQ⁻), которая образуется на FeS_{III} и затем окисляется гемом b_l . Такой компонент действительно был описан [114, 449, 875]. Есть указание, что одна из малых субъединиц CoQH₂-цитохром c -редуктазы играет роль стабилизатора семихинона [1645], который в определенных условиях может перемещаться поперек мембраны [1252].

Суммируя рассмотрение механизма ДРН-генерации комплексом bc_1 , мы хотели бы подчеркнуть, что один существенный момент представляется достаточно твердо установленным, несмотря на обилие неясностей в деталях обсуждаемого механизма. Показано, что перенос одного восстановительного эквивалента от CoQH₂

к цитохрому *c* приводит к транслокации одного заряда, причем этот процесс сопровождается выделением двух ионов H^+ в межмембранное пространство.

3.4.4.3. Взаимосвязь с $CoQH_2(PQH_2)$ -цитохром *c*-редуктазами бактериальных фотосинтетических цепей

Свойства митохондриальной $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазы во многом сходны с таковыми гомологичных ферментных комплексов в фотосинтетических редокс-цепях хромофоров пурпурных бактерий и тилакоидов цианобактерий. Была показана даже взаимозаменяемость комплексов bc_1 митохондрий и хромофоров. Комплекс bc_1 из митохондрий млекопитающего был реконструирован в протеолипосомах с комплексом фотосинтетических реакционных центров из хромофоров пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Полученная «химера» катализировала циклический фотоперенос электронов, сопряженный с транслокацией H^+ через мембрану протеолипосомы. Отношение H^+/e^- было близко к 2 [1251]. Этот тип протеолипосом может быть применен для изучения быстрой кинетики переноса электронов и генерации $\Delta\bar{U}$ митохондриальной $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазой.

Описана уникальная природная система, где одна и та же PQH_2 — цитохром *c*-редуктаза участвует в темноте в дыхательной цепи, а на свету — в фотосинтетической. Это мембрана тилакоидов цианобактерий.

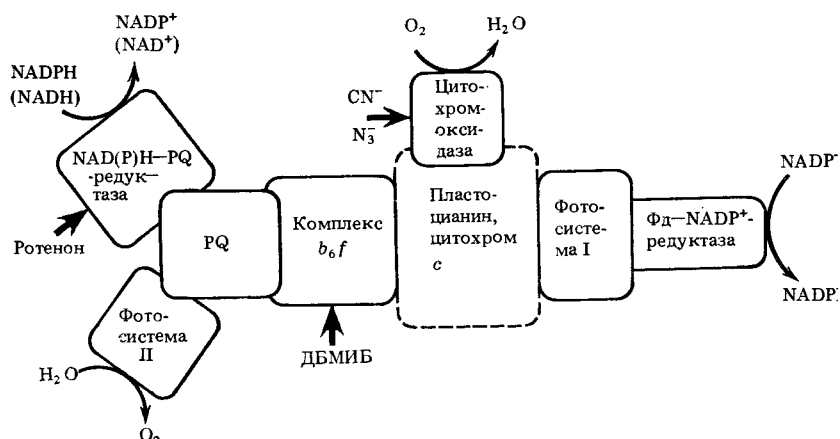


Рис. 46. Предполагаемая организация дыхательной и фотосинтетической редокс-цепей в мембране тилакоидов цианобактерии *Arthancarsa*. Места действия ингибиторов показаны жирными стрелками. ДБМИБ — 2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-7-бензохинон (из Зандмана и Малкина [1298])

При освещении пластохинон, комплекс b_6f , цитохром *c* и пластоцианин обеспечивают связь фотосистем I и II. В темновой период суток те же компоненты принимают участие в дыхательной цепи между $NAD(P)H-CoQ$ -редуктазой и цитохромоксидазой [168, 1186, 1298] (рис. 46).

По мнению Пешека, в цитоплазматической мембране цианобактерий содержится только дыхательная цепь. Что касается H^+ -АТФ-синтазы, то она, по-видимому, есть как в тилакоидной, так и в цитоплазматической мембранах [1186].

3.4.5. Цитохромоксидаза

Цитохромоксидаза катализирует окисление восстановленного цитохрома *c* молекулярным кислородом. Эта реакция сопряжена с генерацией $\Delta\bar{H}$, что было показано как на природных мембранах, так и на протеолипосомах (см. обзоры: [488, 1597, 1598]).

3.4.5.1. Цитохром *c*

Восстановитель цитохромоксидазы цитохром *c* представляет собой очень стабильный небольшой гемопротеид, состоящий из 104 аминокислот и гема *c*. Гем ковалентно связан с апобелком (через SH-группы Cys-14 и Cys-17). Это отличает цитохромы типа *c* от цитохромов *a*- и *b*-типов, где гемы связаны нековалентно. Вуд [1623] полагает, что прочная связь гема с апоцитохромами типа *c* обусловлена тем, что все такие цитохромы расположены на внешней стороне мембраны митохондрии или бактерии. Нековалентно связанный гем мог бы диссоциировать и разбавиться цитозолем (митохондрией) или периплазмой, а затем и внешней средой (бактерией).

Лиганды железа V и VI образованы имидазолом His-18 и серой Met-80. Обе эти аминокислоты инвариантны во всех известных цитохромах *c*, в то время как многие другие варьируют, если сравнивать различные виды организмов. Например, полностью совпадают первичные структуры цитохромов *c* человека и шимпанзе. Между человеком и лошадью есть различия по 12 аминокислотам, при сравнении человека и нейроспоры различий оказывается уже 44.

Трехмерная структура цитохрома *c*, выясненная посредством рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,2 нм [1484], показана на рис. 47.

Цитохром *c* соединяется с той областью $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазы, которая содержит цитохром c_1 . Во взаимодействии участвует богатая лизинами часть цитохрома *c* (Lys-13, -72, -86 и, может быть, -79, -27). В цитохромоксидазе также есть место связывания цитохрома *c*. Оно локализовано на субъединице II. В связывании участвуют анионы карбоксильных групп Asp-158, -112

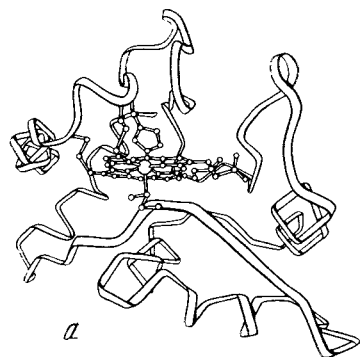
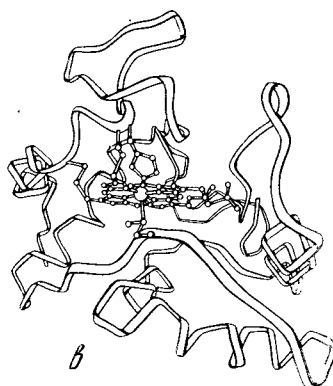
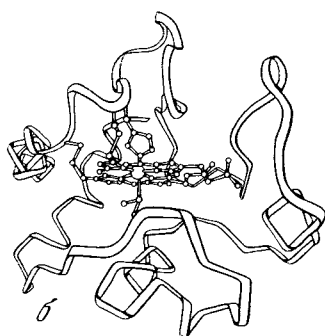


Рис. 47. Пространственные структуры цитохромов с из мышц тунца (а) и *Parasoccus denitrificans* (б) и цитохрома c_2 из *Rhodospirillum rubrum* (в) (по: Саламме, [1293])



и Glu-198, -144, образующие солевые связи с катионными (аминными) группами перечисленных выше лизинов.

Общепринято, что окислители и восстановители цитохрома с атакуют край гема, экспонированный в воду. Предполагается, что цитохром с совершает челночные движения между цитохромом c_1 и цитохромоксидазой, диффундируя вдоль поверхности мембраны. Как было показано в опытах с протеолипосомами, содержащими комплекс bc_1 , кардиолипин участвует в специфическом связывании цитохрома с с мембраной [1637].

3.4.5.2. Структура цитохромоксидазы

Цитохромоксидаза митохондрий и некоторых бактерий имеет четыре редокс-центра: два гема a -типа (гем a и гем a_3) и два атома меди (Cu_A и Cu_B).

Полипептидный состав митохондриального и бактериального ферментов различен. Бактериальная цитохромоксидаза содержит два или три типа субъединиц (см. обзор: [1198]). Так, у *Parasoccus denitrificans* обнаружены субъединицы с массами 45 и 28 кДа. У термофильной бактерии PS3, по-видимому, идентичной *B. stea-*

thermophilus, их три (58, 56 и 22 кДа). Другая термофильная бактерия *Thermus thermophilus* имеет субъединицы с массами 52, 37 и 29 кДа. Субъединицы 58 кДа из PS3 и 37 кДа из *Th. thermophilus* содержат в дополнение к гемам a и a_3 и двум атомам Cu еще и гем типа c . Поэтому трехсубъединичные оксидазы термофилов следует рассматривать как комплекс цитохромоксидазы с цитохромом c .

Трехсубъединичная цитохромоксидаза aa_3 -типа (45, 37 и 35 кДа) была обнаружена у дышащей фотосинтезирующей бактерии *Rps. sphaeroides*, а двухсубъединичный фермент — у *Nitrobacter* [1198]. Сверх того, в ферменте содержится еще один атом меди и атом цинка, которые, вероятно, прямо не участвуют в переносе электронов [278].

Намного обширней набор субъединиц в цитохромоксидазе митохондрий из млекопитающих. Она содержит три крупных субъединицы, кодируемых митохондриальной ДНК: субъединицы I (57 кДа), II (26 кДа) и III (30 кДа), а также по крайней мере еще девять более мелких субъединиц, синтезируемых в цитоплазме: IV (17 кДа), V (12,5 кДа), VIa (10,5 кДа), VIb (9,5 кДа), VIc (8,5 кДа), VII (10 кДа), VIIa (5,5 кДа), VIIb (5 кДа) и VIIc (6 кДа) (см. обзоры: [1597, 798, 1598]).

Цитохромоксидаза дрожжевых митохондрий имеет меньший набор субъединиц, чем ее животный аналог. Отсутствуют субъединицы VIb, VIc и VII [798, 1204, 342].

Некоторые прокариотические цитохромоксидазы существуют в виде мономеров (см., например, [1439]), в то время как эукариотические обычно образуют димеры [561].

По данным электронной микроскопии, митохондриальная цитохромоксидаза частично погружена в мембрану, а частично экспонирована в воду. При этом в межмембранное пространство выступает большая (5,5 нм) часть молекулы фермента, а в матрикс — меньшая его часть (1,5 нм). Часть, погруженная в мембрану, равна 4,5 нм (рис. 48).

Для всех субъединиц цитохромоксидазы выяснены аминокислотные последовательности (см. обзоры: [1596—1598]). Некоторые из них приведены на рис. 49. Анализ чередования гидрофобных и гидрофильных сегментов в субъединицах I, II и III показал, что они могли бы содержать соответственно 12, 2 и 7 α -спиральных колонн, пересекающих мембрану (рис. 50).

Общепринятая точка зрения состоит в том, что все редокс-центры цитохромоксидазы локализованы на субъединицах I и II. При этом считается, что Cu_A находится на субъединице II, а остальные центры — на субъединице I.

В субъединице II обнаружен домен, гомологичный Cu-связывающему домену других медьсодержащих белков [1597, 1598]. Кроме того, субъединица II содержит две гидрофобные последовательности (по 25 аминокислот каждая), которые могли бы пере-

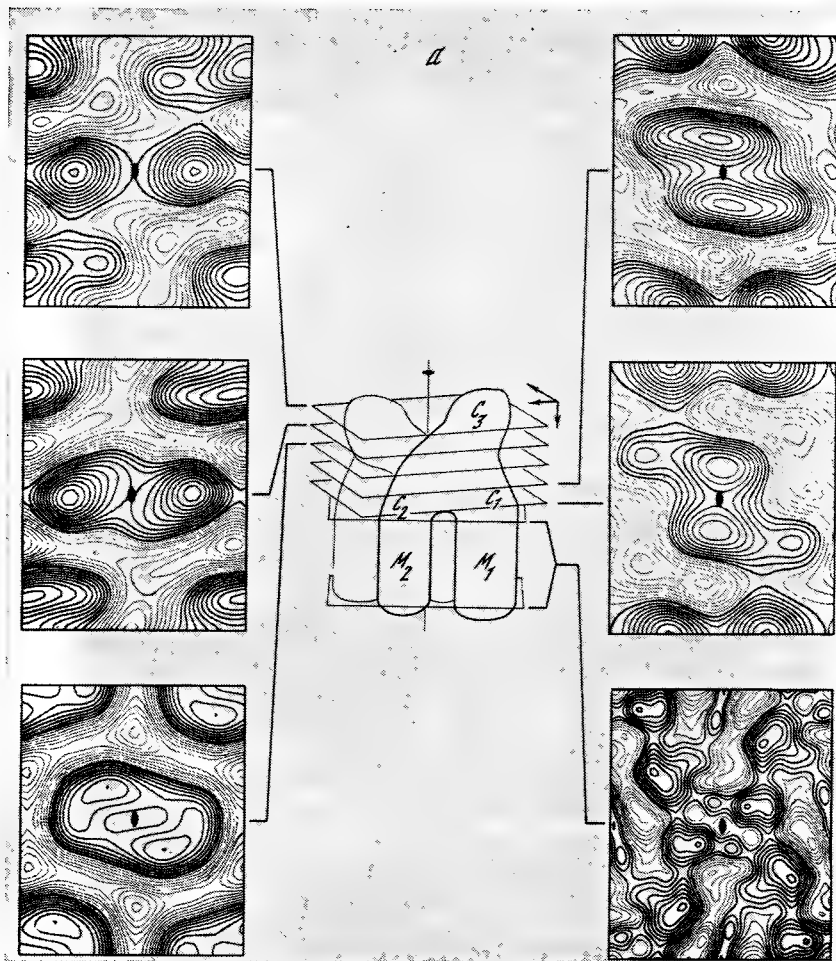
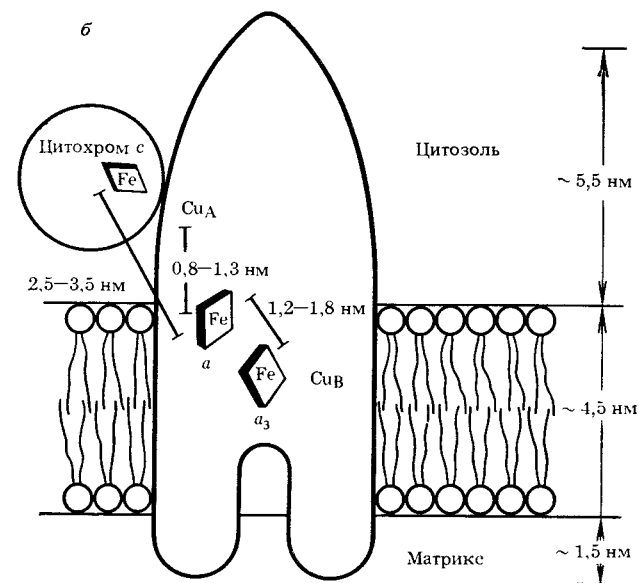


Рис. 48. Размер и форма животной цитохромоксидазы

a — трехмерная модель димера цитохромоксидазы. Показаны срезы, параллельные плоскости мембраны. Верхние пять срезов с интервалом 1 нм показывают карту электронных плотностей. В левом нижнем углу дана проекция карты плоскостей внутримембранного домена на нижний срез. C_1 , C_2 и C_3 — домены, выступающие в межмембранное пространство. M_1 и M_2 — домены, обращенные в матрикс (по: Детерейдж и соавт. [451]); b — схема, иллюстрирующая расположение редокс-центров в мономере цитохромоксидазы. Расстояние между гемами a и a_3 , равное 1,2—1,6 нм, и угол между вектором Fe—Fe и плоскостью мембраны, равный $45 \pm 15^\circ$, были измерены Ониши и соавт. [1134] и Блазье и соавт. [284]. Расстояние Cu_A — гем a , равное 0,8—1,3 нм, было рассчитано Гудингом и Лейхом [627]. Расстояние от гема цитохрома c до ближайшего гема a было определено по переносу энергии флуоресценции [478, 1550]. Антиферромагнитное сопряжение между гемом a_3 и Cu_B предполагалось Ван Гельдером и Бейнертом [1545]; Пауэрс и соавт. [1205] измерили расстояние Fe—Cu, равное 0,38 нм (по: Ониши и соавт. [1133])



секать мембрану, образуя гарпуноподобную структуру с N- и C-концами на одной и той же стороне мембраны [1598]. Трансмембранное расположение субъединицы II подтверждается фактом, что протеиназы атакуют этот белок с обеих сторон мембраны [770].

По-видимому, именно субъединица II взаимодействует с цитохромом c , который мог бы связываться с отрицательно заряженными инвариантными остатками дикарбоновых аминокислот, локализованных в гидрофильном домене субъединицы II.

Две субъединицы цитохромоксидазы паракотка оказались родственными субъединицами I и II митохондриального фермента. В частности, были обнаружены иммунологическая перекрестная активность субъединиц II из митохондрий и паракотка [963] и определенное сходство их первичных структур [336, 1447]. Недавно Сарасте и соавт. [1304] обнаружили в цитохромоксидазном гене паракотка открытую рамку считывания белка, гомологичного митохондриальной субъединице III. Вероятно, эта субъединица терялась при очистке фермента из бактерий.

Как было показано Бузе и соавт. [335], более 75% всего содержания гема цитохромоксидазы открывается в белковой фракции, соответствующей субъединице I. Это указывает, что как гем a , так и гем a_3 связаны с этой субъединицей. Не исключена, однако, возможность миграции гемов с одной субъединицы на другую, так как гемы a ковалентно не связаны с белком.

Показано, что гемы ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны [1597]. При этом гем a расположен ближе к внешней

	20	40	60	80	100
У	MAHAAQVGLQDATSPIMEELLTEHDHAI	MIIGLIC	■FVLYALF	■LLTTLTKLTNTNISD	■AQEMETVWTLILPAIILVLIA
Б	MAYPMQLGFQDATSPIMEELLHFHDHTLMIVFLIS	■SLVLYIIS	■SMLTTLKLTHTSTMD	■AQSVETIWTILPAIILILIA	
К	MAYPFOLGLQDATSPIMEELTNFHDHTLMIVFLIS	■SLVLYIIS	■SMLTTLKLTHTSTMD	■AQSVETIWTILPAVILILIA	
М	MAYPFOLGLQDATSPIMEELMNFHDHTLMIVFLIS	■SLVLYIIS	■SMLTTLKLTHTSTMD	■AQEVETIWTILPAVILIMIA	
Д	MLDLRLQLTTFIMN-DYPTPYACYFQDSATPNQUGILFLHDNI	IMFVLYAVILGLVSNMLYTI	■EVITYSKNPIAYKYLKHGQT	IEVLTWTILPAVILLIIA	
К	MILRSLRCRFLTIALCDAAEPWGLGSQDAATPNMQGII	IDLHHDJFFPIILILVFSNMLVRALWHIHNQETNP	IPQRIVHGGTTHETIEI	WTIPFSVILPFI	

120 140 160 180 200
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
 Q LPSPRLILYMTDEYNQDPISLTJKSIGHQHWVTVETDYGG■■■■■■■■■FNYSMLPPHILPFCPLDLRLDVDNRRVLP I KAP I RMMITSQDVHLHSWAVPILGLK
 B LPSPRLILYMMDEINQPSLTVKVTMGHWWSVEYTDYED■■■■■■■■■SFDsYMIPTSLKPKPGLRLILPVDNRRVLPMEMTI RMLVSSDDVLHSWAVPSLGLK
 K LPSPRLILYMMDEINQPSLTVKVTMGHWWSVEYTDYED■■■■■■■■■LCFDSYMIPTNLKPKGLRLILVDNRRVLPMLLP I RML I SSEDVLHSWA I PSLGLK
 M LPSPRLILYMMDEINQPSLTVKVTMGHWWSVEYTDYED■■■■■■■■■LCFDSYMIPTNDL K PGLRLILVDNRRVLPMLLP I RML I SSEDVLHSWAVPSLGLK
 D PPSFILLVLCDEVI ■SPAI T I KAIGYQWYWKVEYSDFI NDSQFTVILPFSYV I PDLLEHGOI RL I DTHSTSLVVPVDTH I RRVVTAADV I HDFA I PSLGIK
 K I PFSFALLYSMDGVLVDPAIT I KA I GHWQVWSVEYSDYNSSDIQTSDSYT I LPPDDELGQS RLLI LVDNRRVVPKATHRLM I VTPADVPHSWAVPSSGVK

u TDAI PGRLNQTTTATRPGVYVYQCSEICGANHSFMPVLELELPI ■ KIFEMGPTTL 260
 b TDAIPGRLNQTTLMSSRPGLYVYQCSEICGSNHSFMPVLELVPI ■ KYPTFKWCSMI 240
 k TDAIPGRLNQATVTSNRPGLFYQCSEICGSNHSFMPVLEMVVDL ■ KYFENWSML
 m TDAIPGRLNQATVTSNRPGLFYQCSEICGSNHSFMPVLEMVPI ■ KYTFNWSMI
 j VDATPGRLNQVSALIQRSVYFYCACSEIAGTGTHANMP ■ IKIIVASIPKLELFWNQ
 k CDVAVGRSRLTSLVQRIRVYVYQCSEICCTWHATFLVVEATFL ■ KUDYADWVNOLLIQTN

	20	40	60	80	100
Asp	MIYQSRNEQLHPFHLVSESPWPLFTSISLFTLTATATVLFMHCFEGFQYLPVAVINVMYVMGILWFRDVI	SEGTYIGNHTNAVQKGLNIGVGLPIISEVF			
H	MTNLIRSNFQDHPFHLVSPSPWPLNTSVCLLNLTITTCALSMINFNINHYLYYIALIGLVSAMPLWFRDII	SEGTFLDHTLAVQKGLNIGLIILFTVSEAL			
Sac	MTHLERSRHHQHPFHMVMPSPWPIVVSFALLSLALSTALTMHGYIGNNMVYIALFVLLTSSILWFRDIVAET	YLGQHTIAVRKGINIGFLMFLVSEVL			
Q	MTHQSHAYHMVKPSPWPLTGALSALLMTSGLAMWPHFHS	MTLLMLGLLTNTLTMTYQWWRDVTRI	SPYQGHHTPPVQKGLRYGMILFITSEVF		
B	MTHQTHAYHMVNPSPWPLTGALSALLMTSGLTMMWPHFNS	MTLLMTGLTNTNMLTMYQWWRDVI	RESTFQGHHTPAVQKGLRYGMILFITISEVL		
M	MTHQTHAYHMVNPSPWPLTGAFSALLLTSGLVMWPHFYN	STLLTGLLTNTILTMYQWWRDVI	REGTYQGHHTPIVQKGLRYGMILFITVSEVF		

	120	140	160	180	200				
Asp	FFLAIFWAFPHSAISPSVELGAQWPP	LGIGINPFELPL	NTLNTILLSSGV	ITVYAHHS	LIQGNPKGALYGT	VTVTILLAI	VFTFFQGV	EYTVSSFT	ISDSV
H	FFLAIFWAFPHSALTPYELGAQWPP	IGIEPVNPFELPL	NTVILLSSGAT	ITYAHHA	LIKERE	GALYGS	ATILLAI	FTFGQV	EYSVSSFT
Sac	IFAGLEWAYFHSAMSPDVT	LGACWPPV	GVIEAVQTE	LP	PLNTILLSSGAT	VTVYSHHA	LIACGN	KAISGL	LLTFWL
4	FFAGFFWAFYHSSLAP	TPQLGCHW	RTGITPLN	PLEVPL	NTSYLLASGV	SITWAH	HSMLN	NNPNQ	MTQALL
5	FFTGTFFWAFYHSSLAP	TELGCCW	PPGTGIHPLN	PLEVPL	NTSVLLASGV	SITWAH	HSML	QALF	ITITLGV
M	FFAGFFWAFYHSSLV	PTHDLG	CCWPTGTGIS	PLNPLEV	PLNTSVLLASGV	SITWAH	HSML	MEGKRN	HNMNQALL

	220	240	260
Asp	YGSCFYGTGPHGLHVIICTAF LAVGLNRLAAYHLTDHHLGYESGILQWHFVDVAVLFLYISVYWG		
H	FGTCFFSTGFGHIVIICTIFLAVALWRFIYAYHLTDNHHVGFEGGILYNWHFVDVWLFLYISVYWG		
Sac	YGSVIFYAGTCLHFLHMVMLAAMLGVNWRPNVHLTAGHHVGYETTIYTHVLDVINLFLYVTFYWG		
4	YGSIFFYATGFGHGLHVIICSTFLTICFTIQLMEHFTSKHHFGFEAAWYHWFVDVAVLFLYISVYWG		
6	YGSTFFVATCCHGLHVIICGSTFTICVCTPQLCKHFTSNHHFGFDAGAWYHWFVDVAVLFLYISVYWG		
M	YGVVTFMFTFGVFTTIGSTFTVLLLEQIKNHFLTPHFTQAAWYHWFVDVAVLFLYISVYWG		

поверхности, а гем a_3 погружен в мембрану. Расстояние между гемами оценивается в 1,4 нм (рис. 48, б).

Окружение гема a_3 во многом напоминает гемсвязывающую область гемо- и миоглобинов. Пятый лиганд образован гистидином, в то время как место шестого лиганда может занимать O_2 .

Cu_B находится на расстоянии 0,3–0,5 нм от железа гема a_3 [1133, 1134, 1597]. Существует предположение, что Cu_B и Fe гема a_3 могут быть связаны между собой каким-то общим лигандом, который в аэробных условиях замещается молекулой O_2 .

Субъединица III, подобно субъединице I, весьма гидрофобна и, подобно субъединицам I и II, кодируется в митохондриях. Ее возможная роль в переносе протонов цитохромоксидазой будет рассмотрена ниже.

Субъединицы меньшей молекулярной массы, кодируемые ядерным геномом, в основном гидрофильны. Однако такие из них, как, например, субъединица IV, содержат одиночный гидрофобный сегмент, достаточно длинный, чтобы пересечь мембрану [341]. Некоторые другие (например, субъединица V) полностью гидрофильны [644]. Неожиданное наблюдение было сделано при анализе аминокислотной последовательности субъединицы VII. Оказалось, что она содержит сегмент, гомологичный связывающему гем домену цитохрома f и бактериального цитохрома c_{553} [1448].

По данным Куна и Каденбаха [889], кодируемые в митохондриях субъединицы I, II и III идентичны во всех исследованных на этот предмет тканях крысы. В то же время все субъединицы, кодируемые в ядре, были иммунологически различны хотя бы в каких-либо двух тканях. Для этих субъединиц выявлены также различия между тканью эмбриона и гомологичной тканью взрослого животного (исследовали печень, сердце и скелетные мышцы).

Приняв во внимание эти наблюдения, а также тот факт, что цитохромоксидазы бактерий содержат всего два — три полипеп-

Рис. 49. Аминокислотные последовательности субъединиц I — III митохондриальных цитохромоксидаз

Идентичные и консервативные остатки подчеркнуты. I — вставки; Ч — человек, Б — бык, М — мышь, Д — дрожжи, Н — нейроспора, Кр — крыса, К — кукуруза, Asp — Aspergillus, Sac — Saccharomyces;

a — субъединица I. Указаны две неопределенности в субъединице I из дрожжей (положения 60 и 73) в местах стыковки экзона и интрона (по: Викстрем и соавт. [1598]; Андерсон и соавт. [163, 164]; Бибб и соавт. [255]; Бониц и соавт. [280] и Бургер и соавт. [333]); b — субъединица II митохондриальных цитохромоксидаз. Белки из дрожжей и, вероятно, также из кукурузы образуются в виде предшественников, удлиненных с N-конца полипептидной цепи. В этих случаях N-концевым остатком зрелого белка служит, по-видимому, Asp-17. Стрелки указывают инвариантные дикарбоновые кислоты, которые могли бы отвечать за связывание цитохрома c . Вероятные лиганды меди помечены звездочками (по: Викстрем и соавт. [1598]; Андерсон и соавт. [163, 164]; Стеффен и Бузе [1449]; Бибб и соавт. [255]; Браун и Симпсон [309]; Фокс [578]; Корруци и Цаголов [404] и Фокс и Ливер [579]);

c — субъединица III (по: Викстрем и соавт. [1598]; Андерсон и соавт. [163, 164]; Бибб и соавт. [255]; Таленфельд и Цаголов [1503]; Браунинг и Радж Бхандари [316] и Нейвер и соавт. [1100])

тида, гомологичные митохондриальным субъединицам I—III, можно было бы предположить, что функции легких субъединиц цитохромоксидазы митохондрий связаны с регуляцией этого фермента в клетках эукариот [797]. Не так давно было описано прямое действие ATP и ADP на активность цитохромоксидазы в протеолипосомах [751].

3.4.5.3. Путь переноса электронов

Есть ряд фактов, указывающих на то, что электрон, отнятый от цитохрома c , переносится непосредственно на Cu_A . Этот редокс-центр цитохромоксидазы находится ближе всего к поверхности фермента, обращенной в межмембранное пространство. Cu_A располагается на субъединице II, ответственной, по всей вероятности, за связывание цитохрома c с цитохромоксидазой. Функционально субъединица II напоминает пластоцианин — медьсодержащий белок хлоропластов, окисляющий цитохром c -типа (цитохром f).

Двигаясь в направлении от поверхности в глубь мембраны, электрон переносится от Cu_A к гему a и далее к комплексу гема a_3 и Cu_B , последнему компоненту дыхательной цепи, который восстанавливает O_2 :

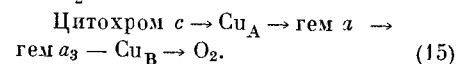
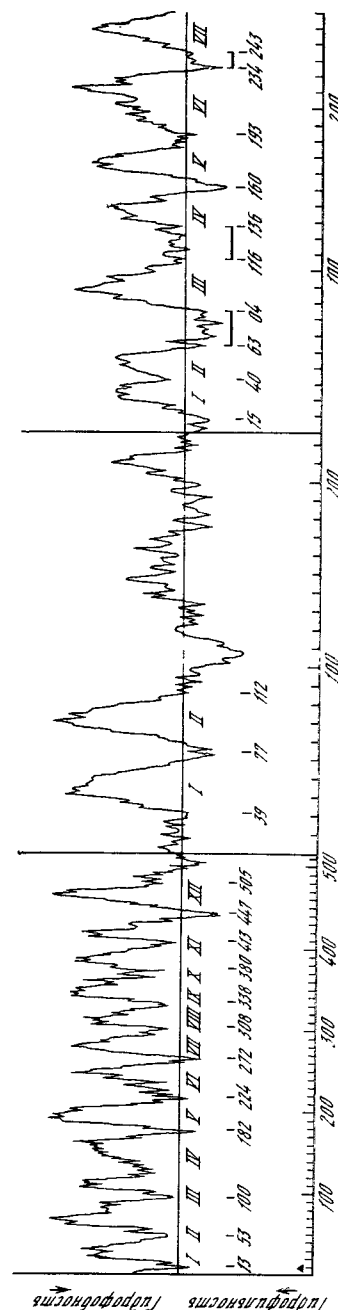


Рис. 50. Профили гидрофобности субъединиц I, II и III цитохромоксидазы бычьих митохондрий

Номера аминокислотных остатков указаны на абсциссе. Римские цифры обозначают предполагаемые трансмембранные α -спиральные колонны, образованные гидрофобными аминокислотами (по: Викстрем и соавт. [1598])



Предполагается, что молекула кислорода, связываясь с цитохромоксидазой и восстанавливаясь, образует перекисный интермедиат, где группа —O—O— играет роль лиганда, связывающего железо гема a_3 и Cu_B [1598].

Следует подчеркнуть, что расстояния между редокс-центрами в цитохромоксидазе оказываются того же порядка, как между протестическими группами в комплексе фотосинтетических реакционных центров *Rps. viridis* или как между двумя гемами в цитохроме *b*. Это означает, что механизм переноса электронов во всех названных случаях может быть общим.

В то же время не исключены и взаимодействия, специфичные для цитохромоксидазы. Так, например, предполагается, что перенос электронов от Cu_A , сидящей на субъединице II, к гему *a* на субъединице I происходит через кластер ароматических аминокислот, включающий два остатка триптофана и четыре остатка тирозина [335].

3.4.5.4. Механизм генерации ДФН

В первоначальном варианте хемосмотической гипотезы Митчел [1043] предположил, что зарядка мембраны посредством ДФН-генераторов редокс-типа обусловлена трансмембранным перемещением электронов (схема «петель»). Позднее этот принцип был в основном подтвержден применительно к фотосинтетическим реакционным центрам.

На первый взгляд подобная схема неприменима к цитохромоксидазе, поскольку показано, что редокс-центры этого фермента располагаются так близко друг к другу и к внешней поверхности мембраны, что электрон может быть перенесен на расстояние, не превышающее половины толщины мембраны (см. выше рис. 48, б). Однако не исключено, что щель между доменами M_1 и M_2 , видная под электронным микроскопом (рис. 48, а), достаточно глубоко проникает в толщу мембраны, чтобы пересечь внутренний липидный монослой. В этом случае край гема a_3 мог бы оказаться в контакте с водной фазой матрикса.

Более существенно, что схема «редокс-петли» оказывается неспособной объяснить важное наблюдение, сделанное Викстромом ([1593, 1595]; см. также [1585]). Было показано, что добавление доноров электронов (ферроцианида либо цитохрома *c*) к митохондриям или цитохромоксидазным протеолипосомам вызывает временное закисление инкубационной среды, которое обусловлено работой цитохромоксидазы и снимается разобщителями — протонифорами. Как удалось установить в опытах с протеолипосомами, ионы H^+ , выделенные в среду, черпаются из внутреннего пространства этих пузырьков: заметное закисление имело место лишь в том случае, если пузырьки содержали рН-буфер [1597, 1598].

Эти наблюдения находятся в противоречии со схемой «редокс-петли», согласно которой окисление донора электронов должно вызывать защелачивание внутри митохондрии (протеолипосомы) без всякого закисления снаружи.

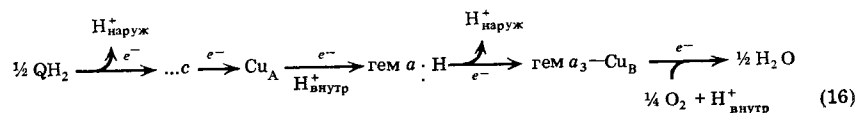
Качественный эксперимент Викстрема был затем подтвержден расчетом количества ионов H^+ , выделяющихся при окислении митохондриями донора электронов. Отношение H^+/e^- оказалось равным единице. В вывернутых субмитохондриальных пузырьках цитохромоксидазная реакция сопровождалась защелачиванием среды, причем отношение H^+/e^- было близко к двум. Как в митохондриях, так и в вывернутых пузырьках цитохромоксидаза генерировала $\Delta\Psi$ (внутри митохондрий знак «минус», внутри пузырьков — «плюс»). И в том, и в другом случае перенос одного электрона от цитохрома *c* к кислороду сопровождался транспортом двух зарядов через мембрану [1597].

Все эти соотношения могут найти свое объяснение в рамках схемы, изображенной в общем виде на рис. 41, а (см. выше). Как видно из схемы, окисление одной молекулы цитохрома *c* кислородом имеет следствием трансмембранный перенос двух зарядов благодаря взаимодействию следующих процессов: 1) переноса одного электрона на полумембранную толщину (от цитохрома *c* к a_3); 2) переноса одного протона на полумембранную толщину (из матрикса к гему a_3); 3) переноса еще одного протона через всю толщу мембраны (из матрикса в межмембранное пространство).

Описанная система получила название цитохромоксидазного протонного насоса. Ее конкретный вариант, изображенный на рис. 41, а, постулирует существование двух отдельных ДФН-генераторов, включенных последовательно на конечном отрезке дыхательной цепи, т. е. между цитохромом *c* и O_2 . Изменение редокс-потенциала на этом участке равно 0,57 В. Эта величина столь значительна, что освобождающейся энергии хватит не только на два пункта энергетического сопряжения, но и на обеспечение необратимости последней стадии внутриклеточного дыхания.

В принципе говоря, общий окислительно-восстановительный процесс, катализируемый цитохромоксидазой, можно разбить на две группы парциальных реакций, одна из которых характеризуется изменением редокс-потенциала от +0,22 В до +0,38 В, а другая — от +0,38 В до +0,82 В. Было обнаружено, что система гемов *a* — a_3 характеризуется двумя среднеточечными редокс-потенциалами, в которые вносят вклад оба гема (+0,22 В и +0,38 В). Оба перехода зависят от рН, как если бы восстановление сопровождалось присоединением протона [1597]. В то же время редокс-потенциалы Cu_A и Cu_B (0,24 В и 0,34 В) от рН не зависят [542, 946].

На основе этих фактов может быть предложена следующая линейная схема конечного сегмента дыхательной цепи:



Существенным моментом в этой схеме является то, что восстановление гема *a* приводит к его протонированию ионом H^+ матрикса ($H^+_{\text{внутр}}$), а окисление — к освобождению этого иона H^+ снаружи митохондрии ($H^+_{\text{наруж}}$).

Альтернативный механизм устройства цитохромоксидазного $\Delta\bar{p}H$ -генератора (О-цикл) был недавно постулирован Митчелом и соавт. [1057]. Его описание будет дано в следующем разделе (3.4.6).

Любая схема устройства цитохромоксидазы предполагает, что в молекуле фермента существуют H^+ -проводящие пути, пересекающие значительную часть гидрофобного барьера мембраны. Первое указание в пользу такой возможности было получено в нашей лаборатории А. А. Константиновым и соавт. [74, 193]. Было выяснено, что рН-зависимость редокс-потенциала присуща не только цитохрому a_3 (который передает электроны на O_2 с последующим присоединением ионов H^+ и образованием воды), но также и цитохрому *a*. Оказалось, что редокс-потенциал цитохрома *a* может отвечать на изменение рН по другую сторону мембраны, т. е. в матриксе.

В опытах той же группы была исследована рН-зависимость реакции связывания дианида с гемом a_3 . Было показано, что $\Delta\psi$, наложенная на мембрану, меняет эту зависимость таким образом, как если бы гем a_3 находился в средней части мембраны и был связан с матриксом «протонным колодез» [6].

Неясно, что за группа в молекуле цитохромоксидазы принимает протон при восстановлении гема и отдает протон при его окислении. Викстремом было высказано предположение, что эта группа принадлежит самому гему *a* (такую роль могли бы играть формильный карбонил или пропionateный карбоксил) [1597]. Что касается протонпроводящего пути, связывающего эту группу с водной фазой, то он мог бы быть организован полипептидной частью фермента. Какую-то роль здесь безусловно играет субъединица III цитохромоксидазного комплекса. В пользу этого указывают три факта.

1. Субъединица III служит мишенью действия ДЦКД, который, как показали Кейси и соавт. [352], тормозит выброс протонов из митохондрий, окисляющих доноры электронов. В митохондриях, обработанных ДЦКД, перенос одного электрона цитохромоксидазой сопровождается транслокацией одного (вместо двух в контроле) зарядов через мембрану. Было найдено [1213], что ДЦКД специфически модифицирует Glu-90 в субъединице III. Этот остаток локализован на полпути от одной поверхности мембраны

к другой, находясь в среднем участке третьей α -спиральной колонны субъединицы III [1597].

2. Протеолипосомы с цитохромоксидазой, лишенной субъединицы III, имеют сниженное отношение заряд/ e^- , равное, по одним данным, 1 [1303], а по другим — 1,25—1,50 [1214, 1217, 1305].

3. Снижение отношения заряд/ e^- может быть вызвано добавлением антител к субъединице III. В тех же условиях антитела к субъединицам II и IV тормозят перенос электронов без снижения этого соотношения [358].

Действие ДЦКД на цитохромоксидазу напоминает эффект того же ингибитора в H^+ —АТР-синтазной системе, где он модифицирует остаток дикарбоновой аминокислоты в среднем участке α -спирали, принадлежащей H^+ -проводящей субъединице (см. ниже раздел 5.1.1.5). В то же время между двумя этими эффектами есть и различие: в случае цитохромоксидазы ДЦКД почти не снижает скорость ферментативной реакции (окисления цитохрома с кислородом), а в случае H^+ —АТР-синтазы он блокирует катализируемый ею процесс, т. е. синтез и гидролиз АТР. Создается впечатление, что цитохромоксидаза в отличие от H^+ —АТР-синтазы может работать в двух режимах, транспортируя через мембрану один заряд или два заряда на каждый электрон, перенесенный с цитохрома *c* на O_2 .

Простейшее объяснение функции субъединицы III и эффекта ДЦКД могло бы состоять в том, что эта субъединица образует ДЦКД-чувствительный протонпроводящий путь, подобный таковому в H^+ —АТР-синтазе. Однако есть факт, затрудняющий такое толкование. Протеолипосомы с цитохромоксидазой, лишенной субъединицы III, все еще способны к выбросу протонов при окислении доноров электронов, хотя количественно этот выброс примерно вдвое меньше, чем в норме [1217, 1305]. Может быть, субъединица III необходима для димеризации цитохромоксидазных комплексов. Замечено, что соотношение заряд/ e^- , равное 2, присуще только димерной форме цитохромоксидазы [561, 1439]. Обратимое образование димеров могло бы служить регулятором эффективности цитохромоксидазы.

Заманчиво предположение, что эффективный режим используется в условиях активного окислительного фосфорилирования, что увеличивает выход АТР в расчете на молекулу окисленного субстрата. В состоянии, когда АДФ исчерпан и наступает состояние протонного контроля, мог бы включаться менее эффективный режим, при котором увеличивается расход энергии на синтез одной молекулы АТР. Это привело бы к увеличению соотношения $[АТР] \cdot [АДФ] \cdot [P_i]$, т. е. возрастанию фосфорилирующего потенциала, что способствует совершению работы за счет АТР.

В принципе можно представить себе ситуацию, когда эффективность $NADH$ -оксидазной системы (H^+/O) снижается от десяти (полный набор $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, включающий высокоэффектив-

ную цитохромоксидазу) до двух ($NADH \rightarrow \Phi p_5 \rightarrow b_5 \rightarrow c \rightarrow aa_3 \rightarrow O_2$), где имеется только один пункт энергетического сопряжения — цитохромоксидаза, работающая с соотношением заряд e^- , равным 1 (о Φp_5 и b_5 см. раздел 6.2.4.7).

Соотношение заряд/ e^- , превышающее 1, было получено на протеолипосомах с цитохромоксидазой из термофильной бактерии PS3 [1438, 1440] или из *Paracoccus denitrificans* [1436].

По меньшей мере в последнем случае изолированная цитохромоксидаза не содержит ни субъединицы III, ни места связывания ДЦКД [1597]. Расщепление трипсином наиболее легкой (третьей) субъединицы цитохромоксидазы PS3 не влияет на транспорт протонов [1637]. Система из PS3 (но не из *P. denitrificans*) чувствительна к ДЦКД [1964].

Отношение заряд/ $e^- > 1$ было описано для цитохромоксидазы из *Thiobacillus novellus*, в то время как для ферментов из *Rps. sphaeroides* и *Nitrobacter agilis* это отношение было ≤ 1 [601, 1964].

Следует отметить, что энергопреобразующая дыхательная цепь целого ряда бактерий заканчивается оксидазами, отличными от фермента aa_3 -типа. Среди них — цитохром a_1 , оксидазы, содержащие протогем, такие, как самоокисляющиеся цитохромы типа b (цитохром o и др.), а также оксидазы с хлориновым гемом, например, цитохром d (старое неверное название — цитохром a_2) и с модифицированным хлориновым гемом и гемом c (цитохром cd_1) (см. обзоры: [1198, 1624]). Для некоторых из этих оксидаз были получены прямые доказательства генерации $\Delta\bar{p}$ или $\Delta\bar{p}H$. Такого рода опыты были поставлены на уровне протеолипосом с цитохромом o [675, 999—1001, 1077] и комплексом цитохрома d [868, 1038] из *E. coli*, а также с оксидазой b -типа из *Rhodospirillum rubrum* [746].

Цитохром o из *E. coli* состоит из четырех полипептидов (66, 35, 22 и 17 кДа), двух гемов типа b (b_{558} и b_{563}) и двух ионов меди [674]. Он окисляет $CoQH_2$, восстановленный ФМС, но не цитохром c . Этот фермент ответствен за поглощение кислорода клетками *E. coli*, выращенными в нормоксических условиях. При снижении уровня O_2 в среде на смену цитохрому o приходит другой фермент, окисляющий $CoQH_2$, а именно комплекс d , включающий два полипептида, гемы b_{558} , a_1 и d [1037]. Оксидазные комплексы типа o и d переносят через мембрану только один заряд на каждый проходящий через них электрон.

Для оксидазы из *Rps. capsulata* было получено отношение заряд/ $e^- > 1$. Эта оксидаза представляет собой димер, составленный из двух субъединиц по 65 кДа каждая, причем на димер приходится один гем [745].

Трансформация энергии была обнаружена в конечном участке дыхательной цепи *Thiobacillus ferrooxidans*. Однако неясно, связана ли генерация $\Delta\bar{p}H$ с терминальной оксидазой (цитохромом a_1) или с предшествующей стадией переноса электронов.

3.4.6. Три цикла в дыхательной цепи

Выше мы рассмотрели возможные механизмы трех $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в дыхательной цепи: $NADH$ — CoQ -редуктазы, $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазы и цитохром c -оксидазы. Среди них наиболее изучен $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазный генератор. Схема Q -цикла, описывающая этот сегмент дыхательной цепи, в настоящий момент выглядит экспериментально доказанной по крайней мере на качественном уровне. Быть может, другие два $\Delta\bar{p}H$ -генератора организованы каким-то иным способом, принципиально отличным от Q -цикла. В то же время возможно, что все три дыхательных $\Delta\bar{p}H$ -генератора имеют общие черты.

При обсуждении $NADH$ — CoQ -редуктазного механизма мы рассмотрели наряду с другими вариантами схему флавинового (F) цикла, утверждающую, что генерация $\Delta\bar{p}H$ на этом участке дыхательной цепи обусловлена циклическим переносом восстановительных эквивалентов по типу Q -цикла.

Недавно Митчел и соавт. [1057] предложили схему, подобную Q -циклу, но для цитохромоксидазы (O-цикл).

На рис. 51 мы скомпоновали F-, Q- и O-циклы, чтобы единообразно объяснить превращение энергии во всех трех сегментах дыхательной цепи. Поскольку F- и Q-циклы уже были разобраны выше, сейчас мы остановимся на O-цикле.

Один из вариантов O-цикла, изображенный на рис. 51, предполагает, что редокс-центр Su_A — a в комплексе IV получает электроны из двух источников: от цитохрома c^{2+} и от H_2O_2 . При этом цитохром c^{2+} окисляется до c^{3+} , а H_2O_2 — до O_2 и $2H^+$. Ионы водорода освобождаются в межмембранное пространство, а электроны переносятся в глубь мембраны к локализованному там редокс-центру Su_B — a_3 . Этот центр восстанавливает O_2 таким образом, что образуется по одной молекуле H_2O_2 и H_2O на три атома кислорода ($1,5 O_2$) и четыре иона H^+ , поступающие из матрикса. Чтобы замкнуть цикл, необходимо постулировать обмен перекисью водорода и кислородом между центрами Su_A — a и Su_B — a_3 .

Одно из предсказаний схемы O-цикла, а именно существование двух мест взаимодействия цитохромоксидазы с H_2O_2 , было недавно подтверждено в нашей лаборатории А. А. Константиновым и Т. В. Выгодиной [43].

Три $\Delta\bar{p}H$ -генератора, показанные на рис. 51, имеют следующие общие черты: 1) перенос заряда на расстояние полумембраны происходит за счет антипорта электрона и атома водорода; 2) перенос заряда через остальную часть мембраны осуществляется путем унипорта протона.

Важно, что эффективность дыхательной цепи, включающей три цикла, намного выше той, что была первоначально постулирована в схеме редокс-петель Митчела [1043]. Здесь на каждую молекулу

3.4.7. Укороченные дыхательные цепи, генерирующие $\Delta\bar{p}H$

Для большинства бактерий эффективность дыхательной цепи оказывается ниже, чем в митохондриях. Это обстоятельство может быть следствием по крайней мере трех разных причин: 1) более простого устройства механизма переноса электронов; 2) шунтирования некоторых $\Delta\bar{p}H$ -генераторов дыхательной цепи системами свободного окисления и 3) укорочения цепи при использовании доноров электронов, по редокс-потенциалу более положительных, чем NADH, или акцепторов электронов, более отрицательных, чем O_2 .

Как уже отмечалось выше (раздел 3.4.4), NADH—CoQ-редуктаза *E. coli* выглядит как упрощенный вариант гомологичного фермента митохондрий. Она содержит только два редокс-центра (FMN и один FeS-кластер) вместо шести в митохондриях. Ротенон, амитал и другие ингибиторы, блокирующие перенос электронов между FeS_2 и CoQ, не влияют на дыхательную цепь *E. coli*. Это обстоятельство может иметь большой биологический смысл, так как именно восстановление CoQ является наиболее медленным и легко уязвимым звеном дыхательной цепи, которое тормозится широким кругом гидрофобных агентов, сильно различающихся по своей структуре (см., например, [231]). Можно предположить, что простая, устойчивая к ингибиторам дыхательная цепь *E. coli* дает этой бактерии известные преимущества для выживания в неблагоприятных условиях. Подобный подход можно использовать для объяснения функции шунтов свободного окисления, которые также типичны для бактериального дыхания.

Альтернативное толкование состоит в том, что *E. coli* находится на более низкой ступени эволюции по сравнению с митохондриями и потому имеет более низкую эффективность начального сегмента дыхательной цепи. Есть данные [1461], что отношение H^+/e^- для NADH—CoQ-редуктазного звена *E. coli* не больше единицы, в то время как в митохондриях оно равно, по всей вероятности, двум.

Такая организация NADH—CoQ-редуктазы не есть свойство, общее для всех бактерий. У *P. denitrificans* соотношение H^+/e^- для того же сегмента цепи, по-видимому, равно 2. NADH—CoQ-редуктаза *Rh. rubrum* чувствительна к ротенону [758].

3.4.7.1. Восстановление нитрата

Есть много примеров, когда уменьшение числа $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в редокс-цепи несомненно оказывается следствием адаптации к специфическим условиям в нише, занимаемой данным видом бактерий.

Наиболее типичным примером такой ниши могут служить среды, в которых нет кислорода, но есть какой-либо другой окислитель с положительным редокс-потенциалом. Так, существует довольно много бактерий, восстанавливающих нитрат до нитрита (редокс-потенциал пары NO_2^-/NO_3^- равен +0,42 В). Если восстановителем служит NAD(P)H (потенциал —0,32 В), то соответствующая редокс-цепь может использоваться для генерации $\Delta\bar{p}H$. Действительно, восстановление нитрата у *E. coli* сопровождается образованием протонного потенциала [1461]. Отношение H^+/e^- должно быть ниже, если NO_3^- служит окислителем вместо O_2 (напомним, что редокс-потенциал пары H_2O/O_2 равен 0,82 В). Измерение коэффициента $ATP/2e^-$ у *Rhizobium japonicum* показало, что эта величина при окислении сукцината кислородом равна двум, а при окислении нитратом — единице [254].

У грибов была обнаружена следующая редокс-цепь для восстановления нитрата:



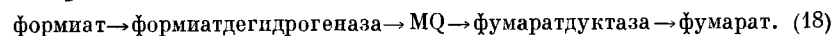
Отношение этой системы к процессам трансформации энергии остается невыясненным.

Нитратредуктаза *E. coli* может быть получена в растворимом виде как комплекс с массой 720 кДа, составленный из четырех тяжелых и четырех легких субъединиц. Он содержит четыре атома молибдена, валентность которого меняется от 5+ до 4+ при восстановлении цитохромом b_{555} , связывающим нитратредуктазу с дыхательной цепью.

Бактериальная нитратредуктаза часто связана с формиатдегидрогеназой, поставляющей электроны для восстановления NO_3^- (см. обзор: [632]).

3.4.7.2. Восстановление фумарата

Восстановление фумарата в сукцинат (редокс-потенциал 0,03 В) также может быть использовано в качестве механизма акцептирования электронов с дыхательной цепи в анаэробных условиях. Как и в предыдущем случае, формиат может служить одним из доноров водорода. Формиатдегидрогеназа и фуматредуктаза были выделены из *Wolinella* (по старой номенклатуре *Vibrio*) *succinogenes* и реконструированы с менахином в протеолипосомы [1535]. Последовательность реакций в этой редокс-цепи, по всей вероятности, описывается следующим образом:



Формиатдегидрогеназный комплекс содержит молибдено-железосульфопроteid (один полипептид) и низкопотенциальный (—0,2 В) цитохром *b* [884].

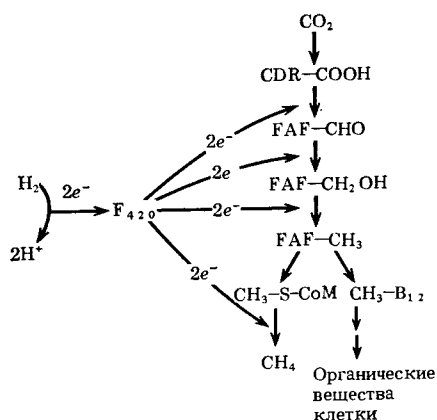
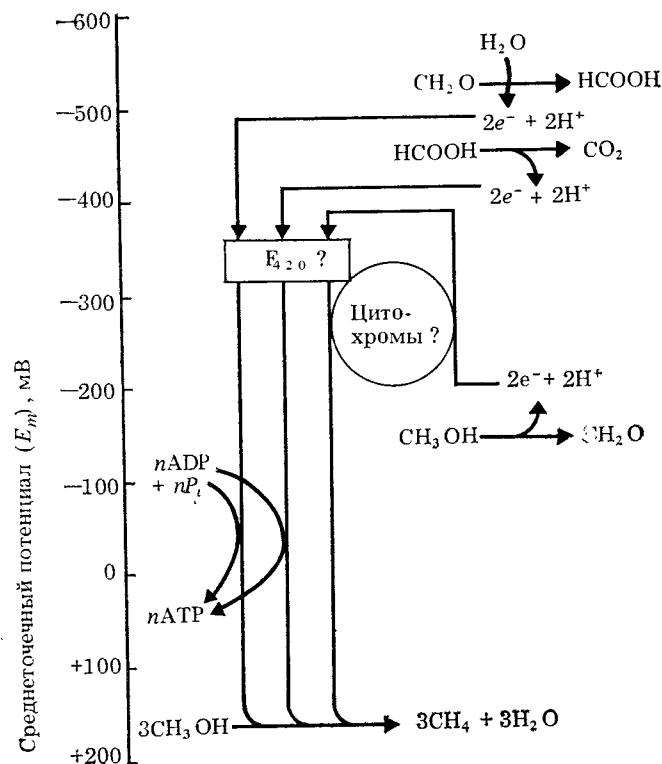


Рис. 53. Схема образования метана из H_2 и CO_2 метанобактериями

F_{420} — деазафлавин, CDR — фактор, восстанавливающий CO_2 ; FAF — фактор, активирующий формальдегид; CoM — кофермент M, B_{12} — витамин B_{12} . (по: Даниэльс и соавт. [422])

Рис. 54. Возможный механизм образования метана из метанола в клетках *Methanosarcina barkeri* (по: Блаут и Готтшалк [267])



Противоположная точка зрения состоит в том, что перенос электронов при метаногенезе сопряжен с синтезом АТФ по принципу субстратного фосфорилирования [411].

3.4.7.4. Окисление субстратов с положительным редокс-потенциалом

Бактерия *Thiobacillus ferrooxidans* служит примером энергетике такого типа. В качестве единственного энергетического ресурса эта бактерия может использовать ион закисного железа (Fe^{2+}), который она окисляет до окисного железа (Fe^{3+}) кислородом воздуха. Редокс-потенциал пары Fe^{2+}/Fe^{3+} равен 0,77 В. Редокс-потенциал пары H_2O/O_2 при нейтральном pH оказывается около 0,82 В. Таким образом, разность потенциалов между окислителем и восстановителем составляет мизерную величину порядка 0,05 В, что далеко недостаточно для генерации ДН порядка четверти вольта, необходимой, чтобы синтезировать АТФ.

Решение вопроса было найдено, когда приняли во внимание зависимость редокс-потенциала пары H_2O/O_2 от pH. Поскольку ионы водорода участвуют в образовании воды из O_2 ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$), этот редокс-потенциал становится более положительным по мере закисления среды, которое сдвигает вправо равновесие реакции восстановления кислорода.

Количественно этот сдвиг равен 0,06 В на единицу pH. Таким образом, например, при pH 3 редокс-потенциал пары H_2O/O_2 будет: $0,82 В + 0,06 В \times 4 = 1,06 В$. Он на 0,29 В положительнее, чем редокс-потенциал пары Fe^{2+}/Fe^{3+} , который от pH не зависит, поскольку в окислении закисного железа ионы H^+ не участвуют. Такая разность потенциалов достаточна для создания ДН, необходимой для синтеза АТФ. Вот почему железобактерии живут только при кислых pH (оптимум для *Th. ferrooxidans* лежит между pH 3 и 1).

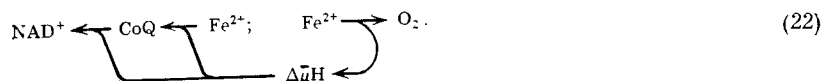
Существуют указания на то, что система окисления Fe^{2+} включает два цитохрома b, несколько цитохромов типа c, два иона меди, а также дугемовый цитохром a_1 в качестве конечной оксидазы. Редокс-потенциалы гемов в цитохроме a_1 равны 0,61 В и 0,725 В при pH 3,2, когда наблюдается максимальная скорость окисления ионов Fe^{2+} суббактериальными частицами. В редокс-цепи, окисляющей Fe^{2+} , по-видимому, принимает участие только один из двух гемов a [756, 1198].

Синтез АТФ — лишь одна из проблем, которые приходится решать *Th. ferrooxidans*. Другая проблема — как использовать донор электронов с положительным редокс-потенциалом для обеспечения биосинтезов восстановительными эквивалентами. *Th. ferrooxidans* может образовывать все компоненты своей клетки из CO_2 , H_2O , NH_3 и минеральных солей. Чтобы достичь этого, необходим какой-то механизм восстановления $NAD(P)^+$ и флавинов

посредством Fe^{2+} . Такое восстановление требует затраты энергии, поскольку редокс-потенциалы $NAD(P)$ и флавинов гораздо отрицательнее, чем у пары Fe^{2+}/Fe^{3+} .

Чтобы преодолеть это затруднение, бактерия использует обратный перенос электронов в средних и начальных сегментах дыхательной цепи. Названный процесс питается энергией $\Delta\bar{p}H$, образуемой в конечном сегменте цепи.

Схема энергообеспечения железобактерий предполагает, что электроны, отнятые от Fe^{2+} , поступают в цитохромоксидазную систему, переносящую электроны на кислород сопряженно с генерацией $\Delta\bar{p}H$. Образующийся протонный потенциал затем используется не только для синтеза АТФ, но и для обеспечения всех прочих видов работы, присущих бактериальной мембране. Кроме того, $\Delta\bar{p}H$ утилизируется, чтобы развернуть вспять $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазную и $NADH-CoQ$ -редуктазную реакции, которые из $\Delta\bar{p}H$ -генераторов становятся потребителями $\Delta\bar{p}H$:



Опыты, проведенные с двумя видами железобактерий Алимом и соавт. [157, 158] и в нашей группе Г. В. Тихоновой [126, 139, 141], показали, что действительно Fe^{2+} может восстанавливать NAD^+ посредством обратного переноса электронов, поддерживаемого энергией, продуцируемой в конечном сегменте дыхательной цепи. В соответствии с этой схемой было также найдено, что *Th. ferrooxidans* содержит огромные количества цитохромов c и цитохромоксидазы, в то время как компоненты среднего и начального сегментов цепи представлены в гораздо меньших количествах. Такая гипертрофия цитохромоксидазной системы объясняет исключительно высокую скорость потребления кислорода на 1 мг белка, которая оказалась в 7 раз выше, чем у митохондрий сердца быка [126]. Этот факт становится вполне понятным, если учесть, что железобактерии располагают только одним $\Delta\bar{p}H$ -генератором, поставляющим необходимую энергию для всех функций клетки.

Fe^{2+} — не единственный донор электронов с положительным редокс-потенциалом, утилизируемый бактериями рода *Thiobacillus*. Как было показано Лу и Келли [960], *Thiobacillus* A2 окисляет тиосульфат в сульфат через цитохром c и цитохромоксидазу:



Процесс сопряжен с синтезом АТФ ($P/O = 1$), причем разобщители-протонофоры блокируют этот синтез.

Ситуация, аналогичная таковой у *Thiobacillus*, имеет место также в случае *Nitrobacter*, окисляющего нитрит. Электроны,

отнятые у нитрита, превращающегося в нитрат (редокс-потенциал $+0,42$ В), донируются цитохромоксидазе, а затем переносятся на O_2 . Этот процесс дает энергию для синтеза АТФ и переноса электронов от NO_2^- к $NADH$ [632, 1198].

Окисление NH_3 до NO_2^- (редокс-потенциал $+0,44$ В) через гидроксилламин используется некоторыми бактериями для восстановления цитохрома типа c и организации энергетической системы, подобной тем, что описаны в этом разделе. У *Nitrosomonas* *europa* в окислении NH_3 , по-видимому, участвует цитохром a_1 [1198].

3.4.8. Пути и эффективность использования $\Delta\bar{p}H$, образуемой дыхательной цепью. Отношение P/O

Протонный потенциал, образуемый дыхательными $\Delta\bar{p}H$ -генераторами, может быть использован для обеспечения всех типов работы, производимых биомембранами.

В типичных дышащих бактериях протонный потенциал потребляется главным образом H^+ -АТФ-синтазой, $\Delta\bar{p}H$ -движимыми транспортерами метаболитов и H^+ -мотором.

В митохондриях последняя система отсутствует, а синтез АТФ представляется главным потребителем $\Delta\bar{p}H$. Это не означает, однако, что альтернативные энергетические потоки количественно незначительны в этих органеллах. Как показывает простой расчет, в условиях, когда синтез немитохондриального АТФ из немитохондриальных АДФ и фосфата служит единственной функцией митохондрии, H^+ -АТФ-синтаза потребляет не более 2/3 от образуемой дыханием $\Delta\bar{p}H$, в то время как остальное используется $ATP^{4-}-ADP^{3-}$ -антипортером и $H_2PO_4^-, H^+$ -симпортером. Такие соотношения являются прямым следствием предположения, что 1) H^+ -АТФ-синтаза образует один внутримитохондриальный АТФ на два иона H^+ , транспортируемые снаружи митохондрий в матрикс, и 2) обмен одного внутримитохондриального АТФ на немитохондриальные АДФ и фосфат сопряжен с переносом одного иона H^+ (см. ниже разделы 5.2.7.2 и 5.2.7.3). Кроме того, транспорт некоторых субстратов дыхания из цитозоля в матрикс требует $\Delta\bar{p}H$. Поэтому H^+ -АТФ-синтаза в действительности поглощает меньше 2/3 энергии, которая в виде $\Delta\bar{p}H$ образуется дыханием, даже в том случае, когда функция митохондрий ограничивается поставкой АТФ. Эта величина должна быть в действительности еще ниже, если принять во внимание, что митохондрии выполняют также функции, альтернативные окислительному фосфорилированию, такие, как транспорт ионов, а в некоторых случаях также и образование тепла. Эти процессы, как и действие шунтов свободного окисления (см. раздел 6.1.1), могут снижать долю H^+ -АТФ-синтазы в использовании энергии, поставляемой дыхательной цепью.

Мерой эффективности дыхания как поставщика энергии для синтеза АТФ может служить отношение количества синтезированного АТФ или эстерифицированного фосфата к количеству потребленного кислорода (АТФ/О или Р/О). Критерий Р/О был предложен в 1939 г. В. А. Белицером и Е. Т. Цыбаковой [18].

Для митохондрий, окисляющих NAD-зависимые субстраты, сукцинат или аскорбат, экспериментально измеренные величины Р/О, как правило, оказываются соответственно около 3, 2 и 1 (см. обзоры: [123, 727]). Возникает вопрос, насколько близки эти значения к теоретически максимальным отношениям Р/О, которые должны были бы наблюдаться при условии, что H^+ —АТФ-синтаза и система антипорта АТФ/(АДР + P_i) являются единственными потребителями $\Delta\mu\text{H}$. Чтобы найти теоретическое отношение Р/О, достаточно разделить на три количество протонов, переносимых из матрикса в межмембранное пространство при восстановлении одного атома кислорода. Делитель, равный трем, берется, исходя из допущения, что синтез одной молекулы внутримитохондриального АТФ сопряжен с возвращением в матрикс двух H^+ , а антипорт АТФ_{внутр}/(АДР + P_i)_{наруж} — одного H^+ .

Из рис. 51 (см. выше раздел 3.4.6) ясно, что общее число ионов H^+ , транспортируемых через мембрану на каждый атом кислорода, равно десяти, если окисляется какой-либо NAD-зависимый субстрат (включены все три дыхательных $\Delta\mu\text{H}$ -генератора). Для сукцината, окисляющегося, минуя NADH—CoQ-редуктазный $\Delta\mu\text{H}$ -генератор, это число равно шести, а для аскорбата, подключающегося к дыхательной цепи на уровне цитохрома с, оно равно четырем. Что касается величины Р/О, то она будет $10 : 3 = 3,3$ для NAD-зависимых субстратов, $6 : 3 = 2,0$ для сукцината и $4 : 3 = 1,3$ для аскорбата. Эти величины близки к таковым, измеренным экспериментально.

Другой довод в пользу приведенных выше теоретических величин Р/О был получен Форманом и Уилсоном [572]. Было выяснено, что дыхательная цепь между NADH и цитохромом с в состоянии протонного контроля (аэробные митохондрии после истощения добавленного АДР) оказывается в равновесии с системой АТФ/(АДР + P_i). В то же время последний сегмент дыхательной цепи далек от такого равновесия [1597], что находится в соответствии со схемами на рис. 41, согласно которым цитохромоксидаза представляет собой единственный сегмент дыхательной цепи, не использующий довольно значительную часть освобождаемой энергии (около 0,1 В).

Следует подчеркнуть, что теоретические величины Р/О при синтезе АТФ внутри митохондрий, а также бактерий или снаружи вывернутых субмитохондриальных (суббактериальных) пузырьков и протеолипосом должно быть выше, чем при синтезе внемитохондриального АТФ. Это превышение есть следствие того обстоятельства, что здесь отсутствует антипорт АТФ/(АДР + P_i).

При этом максимальные значения Р/О для NADH, сукцината и аскорбата оказываются соответственно $10 : 2 = 5$, $6 : 2 = 3$ и $4 : 2 = 2$. Эти цифры намного превышают те, что получены в эксперименте с вывернутыми пузырьками и протеолипосомами. Более того, переход от интактных митохондрий к субмитохондриальным пузырькам или протеолипосомам всегда сопровождается значительным снижением Р/О. Такой эффект обусловлен, по-видимому, тем, что мембраны субмитохондриальных пузырьков и протеолипосом характеризуются более низким электрическим сопротивлением, чем нативная мембрана митохондрий, вплоть до присутствия в препаратах пузырьков фактически незамкнутых мембранных чешуек.

Интересная проблема возникает при рассмотрении дыхательного фосфорилирования в клетках бактерий. Здесь нативная система (интактные бактерии) должна характеризоваться величиной Р/О, равной 5, для NAD-зависимых субстратов, при условии, что действует дыхательная цепь митохондриального типа. Однако расчет показывает, что при столь высокой эффективности начальный и средний сегменты дыхательной цепи должны работать с энергетическим дефицитом, т. е. выделяющейся энергии не может хватить на поддержание реальных величин АТФ/(АДР + P_i), наблюдающихся в клетке. Одним из путей решения этого парадокса может быть предположение о том, что бактериальная H^+ —АТФ-синтаза переносит не два (как в митохондриях), а три иона H^+ на каждый синтезированный АТФ.

Строго говоря, точные величины отношения $\text{H}^+/\text{АТФ}$ неизвестны ни для бактерий, ни для митохондрий. Отношение $\text{H}^+/\text{АТФ}$, равное двум, принимается для митохондрий, главным образом, исходя из измеренных значений Р/О и указаний на то, что экспорт из митохондрий АТФ_{внутр}⁴⁻ в обмен на $(\text{ADP}^{3-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-)$ _{наруж} сопряжен с импортом одного иона H^+ на один АТФ. Если допустить, что антипорт АТФ/(АДР + P_i) может происходить без импорта протона, а H^+ —АТФ-синтаза переносит 3H^+ на один АТФ, то величина Р/О как для митохондрий, так и для субмитохондриальных пузырьков, окисляющих NADH, будет одной и той же и равной 3,3. Такую возможность нельзя исключить, имея в виду многообразие митохондриальных транспортных систем.

Другой путь к решению этой же проблемы состоит в том, что у бактерий $\text{H}^+/\text{АТФ}$ равно двум, а $\text{H}^+/\text{О}$ снижено за счет уменьшения числа пунктов энергетического сопряжения в дыхательной цепи или более простого и термодинамически менее эффективного их устройства. Это обстоятельство может быть одной из причин многочисленных фактов из области бактериальной энергетики, когда оказывается, что та или иная бактерия располагает упрощенными вариантами дыхательной цепи, где сопряженный перенос электронов заменен на свободное окисление в одном или двух из трех энергообразующих сегментов цепи. Описаны также

бактерии, у которых вдвое снижена эффективность того или иного дыхательного ДРН-генератора. Выше (раздел 3.4.5.4) приводились указания на то, что некоторые бактериальные цитохромоксидазы имеют отношение H^+/e^- , равное 1, а не 2, как у митохондрий. Сниженная эффективность вероятна также и для начального сегмента цепи в тех случаях, когда он просто устроен и устойчив к ротенону.

3.5. Бактериородопсин

3.5.1. Принцип действия

В 1971 г. Остерхельт и Стокениус открыли ретинальсодержащий белок в мембранах экстремально галофильной бактерии *Halo-bacterium halobium* [1126]. В дальнейшем было продемонстрировано, что бактериородопсин функционирует как светозависимый H^+ -насос.

Бактериородопсин представляет собой одиночный полипептид массой 26 кДа, что значительно меньше, чем у всех других известных к настоящему времени ДРН-генераторов. Он локализован в специальных областях цитоплазматической мембраны *H. halobium* — так называемых пурпурных бляшках, достигающих 0,5 мкм в диаметре (рис. 55). Других белков в бляшках нет, так что бактериородопсин делает свое дело, так сказать, без помощников. Обычно его молекулы *in vivo* образуют тримеры. Однако и в мономерной форме бактериородопсин эффективен как протонный насос.

Такие процессы, как межмолекулярный перенос окислительно-восстановительных эквивалентов или гидролиз ковалентных макроэргических связей, всегда наличествующие в других ДРН-генераторах, в бактериородопсине не обнаружены.

Согласно современной точке зрения, механизм действия бактериородопсина состоит в следующем. Поглощение фотона остатком ретиналя, ковалентно связанным посредством альдиминной связи с ϵ -аминогруппой Lys-216 в молекуле бактериородопсина, вызывает изомеризацию ретиналя по типу «полностью *транс* → 13-*цис*» (рис. 56). Этот эффект сопровождается очень резким кислотным сдвигом рК иминного азота Шиффова основания, который в *транс*-изомере протонирован. В результате Шиффова основание теряет сродство к протону и депротонируется. Считается, что освобождающийся протон выделяется в виде иона H^+ в водную фазу *снаружи* клетки. Затем происходит темновая *цис-транс*-изомеризация, а рК Шиффова основания возвращается к исходному значению, т. е. сродство основания к протонам вновь возрастает. В результате Шиффова основание протонируется, причем для этой цели используется ион H^+ , поступающий *изнутри* бактериальной клетки. Таким образом, вызванное светом циклическое

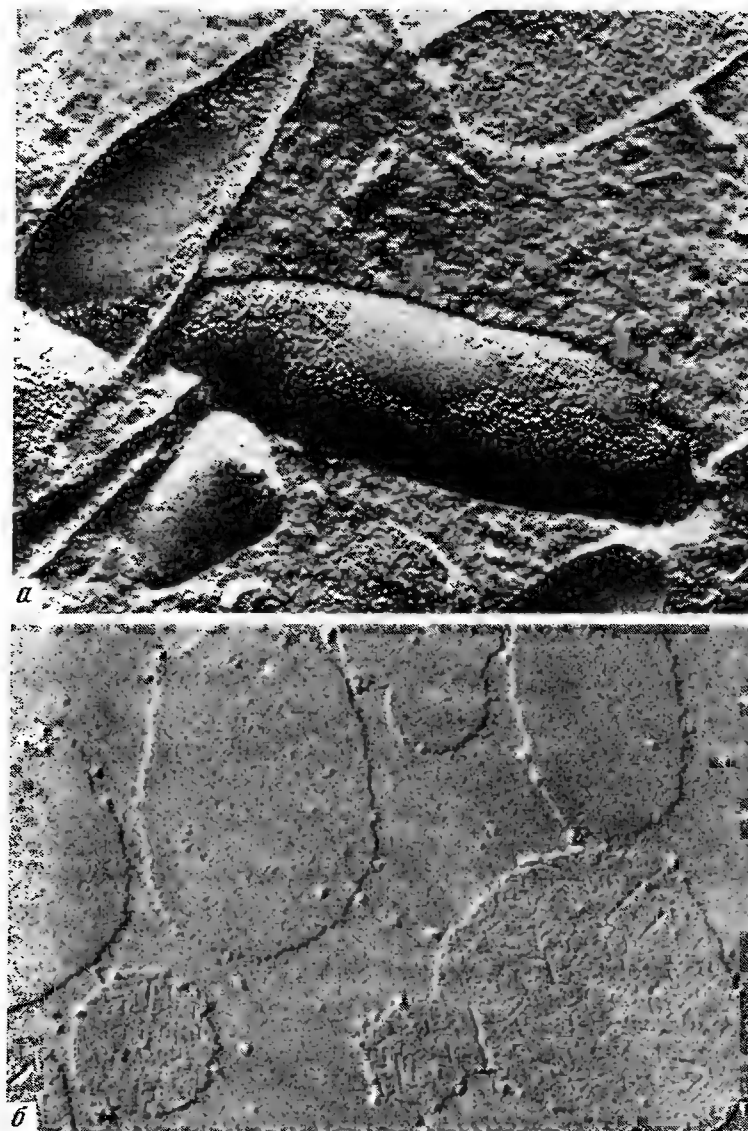


Рис. 55. Пурпурные бляшки — области цитоплазматической мембраны, состоящие из бактериородопсина и фосфолипидов

а — клетки *H. halobium*. Бляшки имеют вид гладких овальных областей; б — изолированные бляшки. На поверхности некоторых видны трещины. Известно, что они образуются с той стороны бляшки, которая обращена наружу клетки (по: Стокениус и соавт. [266, 1128])

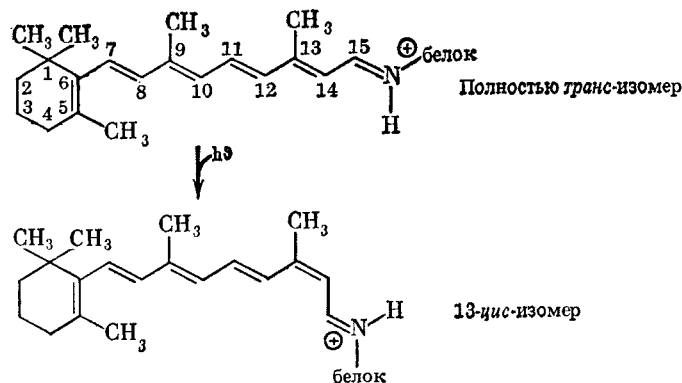
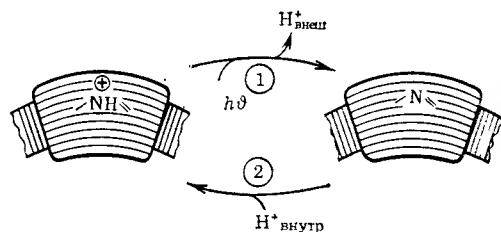


Рис. 56. Светозависимая полностью *транс* → 13-*цис*-изомеризация остатка ретиналя в бактериородопсине

Рис. 57. Простейшая схема действия бактериородопсина как ΔpH-генератора



Горизонтальная и вертикальная штриховка обозначает соответственно бактериородопсин и фосфолипиды. N^{H^+} и N^- — протонированное и депротонированное Шиффово основание, которым бактериородопсин прикреплен к лизину у-216 в бактериородопсиновом полипептиде

превращение бактериородопсина оказывается сопряженным с транспортом иона H^+ через цитоплазматическую мембрану *H. halobium* (рис. 57).

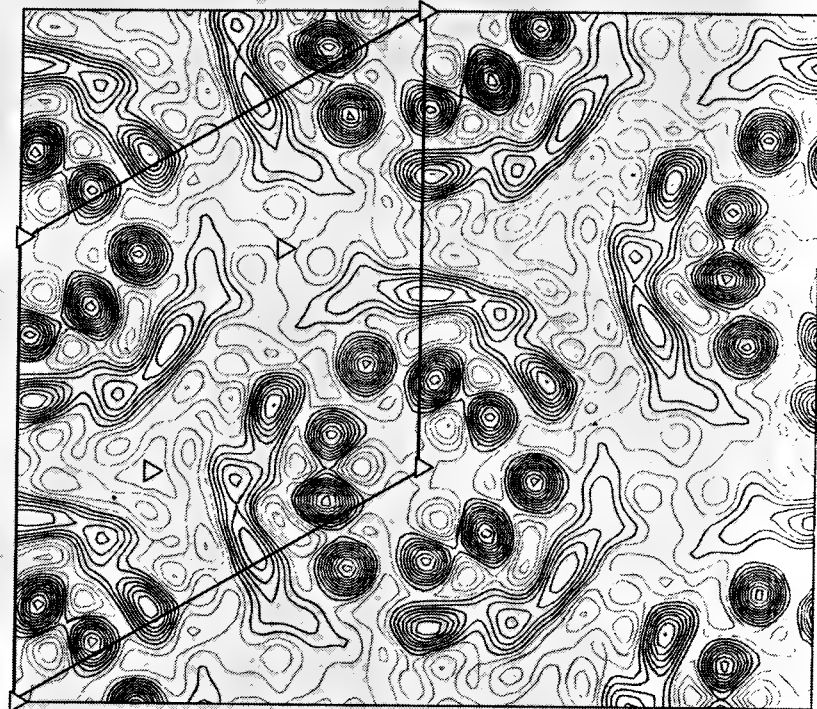
3.5.2. Структура бактериородопсина

Бактериородопсин оказался хронологически первым ΔpH-генератором, для которого удалось выяснить первичную структуру. Это было сделано в 1978 г. Ю. А. Овчинниковым, Н. Г. Абдулаевым и соавт. [103] (см. также [1144—1147]) и позднее (в 1979 г.) Кораной и его коллегами [605]. Было показано, что белок состоит из 248 аминокислотных остатков, образующих 7 гидрофобных последовательностей (по 24—28 аминокислот каждая), прерываемых более короткими гидрофильными последовательностями. Кроме того, на С-конце молекулы белка имеется гидрофильная последовательность, включающая не менее 20 аминокислот (рис. 58).

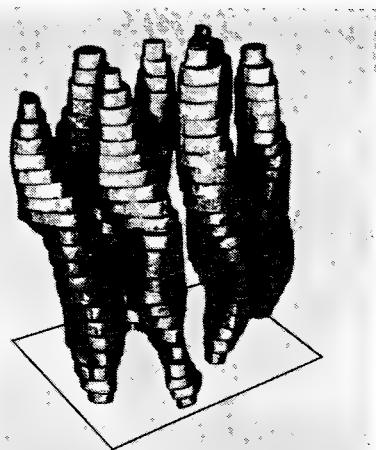
В 1975 г. Гендерсон и Ануин опубликовали пространственную модель бактериородопсина с разрешением порядка 0,7 нм [709,

5	10	15	20	25
<Glu Ala Gln Ile Thr Gly Arg Pro Glu Trp Ile Trp Leu Ala Leu Gly Thr Ala Met Gly Leu Gly Thr Leu				
30	35	40	45	50
Tyr Phe Leu Val Lys Gly Met Gly Val Ser Asp Pro Asp Ala Lys Lys Phe Tyr Ala Ile Thr Thr Leu Val Pro				
55	60	65	70	75
Ala Ile Ala Phe Thr Met Tyr Leu Ser Met Leu Leu Gly Tyr Gly Leu Thr Met Val Pro Phe Gly Gly Glu Gln				
80	85	90	95	100
Asn Pro Ile Tyr Trp Ala Arg Tyr Ala Asp Trp Leu Phe Thr Thr Pro Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Leu				
105	110	115	120	125
Val Asp Ala Asp Gln Gly Thr Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Asx Gly Ile Met Ile Gly Thr Gly Leu Val Gly				
130	135	140	145	150
Ala Leu Thr Lys Val Tyr Ser Tyr Arg Phe Val Trp Trp Ala Ile Ser Thr Ala Ala Met Leu Tyr Ile Leu Tyr				
155	160	165	170	175
Val Leu Phe Phe Gly Phe Thr Ser Lys Ala Glx Ser Met Arg Pro Glu Val Ala Ser, Thr Phe Lys Val Leu Arg				
180	185	190	195	200
Asn Val Thr Val Val Leu Trp Ser Ala Tyr Pro Val Val Trp Leu Ile Gly Ser Glu Gly Ala Gly Ile Val Pro				
205	210	215	220	225
Leu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Phe Met Val Leu Asp Val Ser Ala Lys Val Gly Phe Gly Leu Ile Leu Leu Arg				
230	235	240	245	
Ser Arg Ala Ile Phe Gly Glu Ala Glu Ala Pro Glu Pro Ser Ala Gly Asp Gly Ala Ala Thr Ser				

Рис. 58. Последовательность аминокислот в бактериородопсине (по: Овчинников [1146] и Корана и соавт. [846])



a



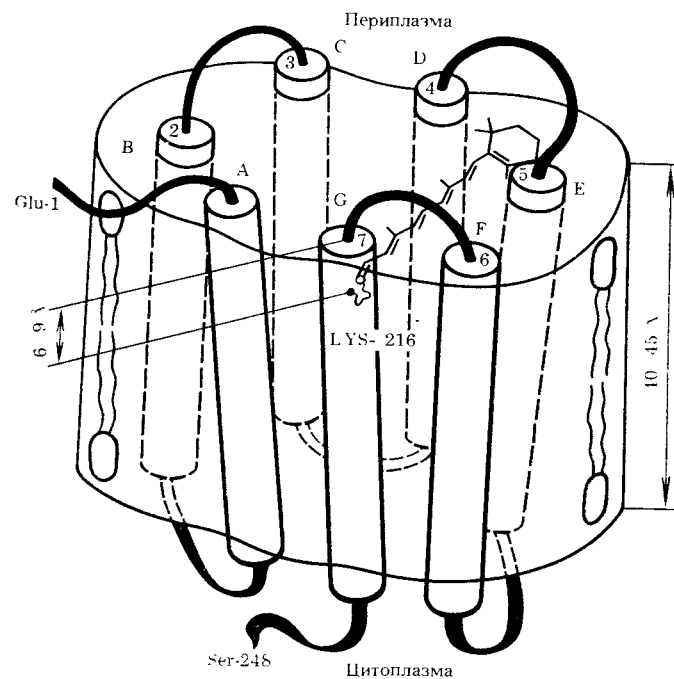
a

Рис. 59. Пространственная организация бактериородопсина

a — карта распределения электронной плотности в пурпурной пленке (проекция на плоскость мембраны). В центре — тример молекул бактериородопсина; ячейка двумерного кристалла; обведен сплошной линией; б — вид сбоку модели одной молекулы бактериородопсина, реконструированной на основе карт распределения электронной плотности (по: Хендерсон и соавт. [1539, 706, 708]); в — схема, иллюстрирующая вероятное расположение семи α -спиральных колонн и остатка ретиналя в молекуле бактериородопсина (по: Набнев и соавт. [96])

1539]. Недавно удалось улучшить разрешение примерно вдвое [708]. Вновь, как и в случае первичной структуры, это был первый пример, когда удалось оценить в общих чертах трехмерную структуру мембранного белка. В этой работе авторы использовали одно из многих уникальных свойств бактериородопсина, а именно его способность образовывать двумерные кристаллы в тех областях бактериальной мембраны, где он локализован *in vivo*. Используя электронный микроскоп и метод анализа дифракции электронов, авторы получили изображения бактериородопсина, показанные на рис. 59. Согласно Хендерсону и Ануину, полипептидная цепь бактериородопсина 7 раз пересекает мембрану, формируя 7 α -спиральных колонн (каждая высотой порядка 3,5 нм), образованных в основном гидрофобными аминокислотами. На рис. 59,б отсутствуют гидрофильные вставки, связывающие гидрофобные колонны, так как разрешение метода слишком низко, чтобы их увидеть.

Сравнив первичную и трехмерную структуру бактериородопсина, Ю. А. Овчинников предложил схему упаковки полипептидной цепи в мембране [1144—1146]. Впоследствии неоднократно публиковались различные варианты этой гипотезы (см., например, [538]).



б

Не так давно Джэп и соавт. [769] опубликовали трехмерную модель бактериородопсина, сильно отличающуюся от той, что была постулирована Хендерсоном и Ануином. Исследуя круговой дихроизм и инфракрасные спектры бактериородопсина, авторы пришли к заключению, что α-спиральные участки составляют не более 52% молекулы этого белка. В то же время заметный процент (26%) структуры имеет характер β-складок. Джэп и его коллеги полагают, что в бактериородопсине имеется не 7, а 5 α-спиральных колонн и 4 β-складки, также пересекающие мембрану [614, 769, 916].

В то же время инфракрасные спектры, измеренные Кортиджо и соавт. [405], указывают на гораздо больший процент α-спиралей и меньший β-складок, что подрывает всю аргументацию Джэпа и др. Все же для окончательного решения проблемы необходим анализ пространственного строения бактериородопсина с лучшим разрешением. Крайне желательным было бы рентгеноструктурное исследование. К сожалению, все попытки получить трехмерные кристаллы бактериородопсина, пригодные для такого исследования, пока остаются безрезультатными.

Твердо установлено, что N- и C-концы полипептидной цепи бактериородопсина находятся по разные стороны цитоплазматической мембраны: N-конец смотрит наружу, а C-конец — внутрь клетки. Это заключение основывается на данных опытов по действию протеолитических ферментов [605, 1144, 1145, 1147] и моноклональных антител [41, 848, 1149] в системах двух типов: суббактериальных частицах с той же ориентацией мембраны, что у клеток, и протеолипосомах с обратной ориентацией мембраны. Эти методы были применены также для локализации гидрофильных связей между α-спиральными колоннами. Показано, что колонны А (ближайшая к N-концу) и В (вторая по счету от N-конца) связаны участком полипептидной цепи, содержащим Asp-36 и Phe-42, которые доступны для антител с цитоплазматической стороны мембраны. Следующая связка (между колоннами В и С) обращена в периплазму и включает Leu-66 и Gly-72. Связка С—D экспонирована в цитоплазму. Она состоит из аминокислот, локализованных где-то между Tyr-83 и Met-119. Обработка лактопероксидазой выявила, что Tyr-131 и Tyr-133 находятся на внешней стороне мембраны, участвуя, по-видимому, в связке D—Е. Связки Е—F и F—G оказались соответственно на внутренней и внешней сторонах, причем было показано, что в связке Е—F для образования антигенной детерминанты существен Phe-156, а в связке F—G — Gly-194 (рис. 60).

Остаток ретиналя в молекуле бактериородопсина связан с Lys-216, локализованным, вероятно, в колонне G [850, 1146].

Методом линейного дихроизма было показано, что полностью транс-ретиналь в молекуле бактериородопсина наклонен под углом 19—28° к плоскости мембраны [713].

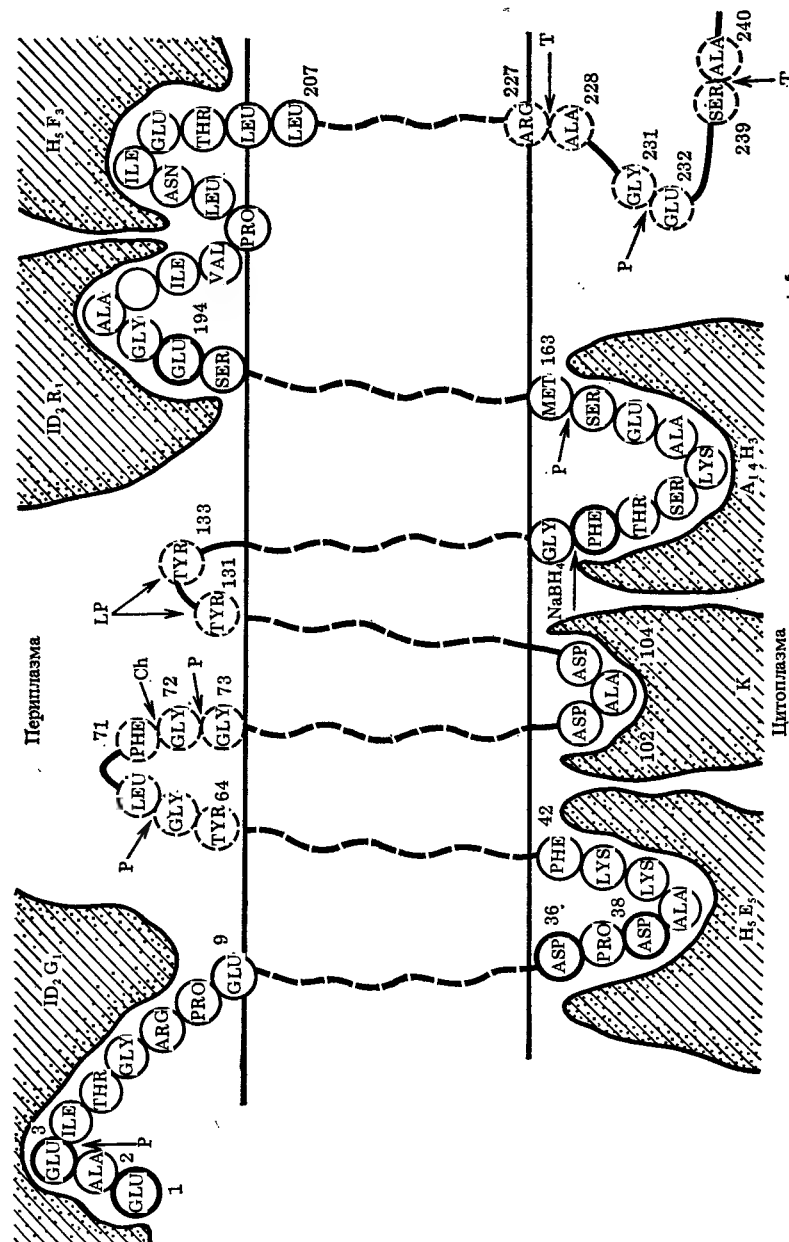


Рис. 60. Топография бактериородопсина, выявленная исследованиями с применением моноклональных антител (ID₂G₁, ID₂R₁, H₅E₆, K и A₁₄H₃), папана (P), химотрипсина (Ch), трипсина (T) и лактопероксидазы (LP)

И. Р. Набиев и соавт. в группе Ю. А. Овчинникова [96] недавно применили спектроскопию гигантского комбинационного рассеяния для изучения положения ретиналя в мембране пурпурной бляшки. Было установлено, что ретиналь залегает на глубине всего 0,6—0,9 нм от внешней поверхности мембраны. Именно такое положение ретиналя было постулировано задолго до этих опытов в нашей группе на основании измерений быстрой кинетики генерации ΔF бактериородопсином (см. ниже раздел 3.5.6). Позднее Друкман и соавт. [510] изучали действие быстрого закисления среды на спектр бактериородопсина в «вывернутых» и «невывернутых» мембранных пузырьках. Результаты опытов также свидетельствовали в пользу локализации ретиналя ближе к внешней поверхности мембраны.

Корана и соавт. [744] предприняли попытку выяснить, с какими аминокислотными остатками контактирует дистальная часть ретиналя (иононовое кольцо). Был синтезирован аналог ретиналя, где иононовое кольцо заменили на фотоаффинную *m*-диазиринофенильную группировку. Бактериородопсин инкубировали в темноте с аналогом и полученный хромопротеид осветили. Последующий анализ показал, что диазириновая группа преимущественно пришивается к Ser-193 и Glu-194. Как уже отмечалось выше, по результатам опытов с антителами остаток Glu-194 находится вблизи внешней поверхности мембраны, участвуя в образовании связки между колоннами F и G. Поэтому данные Кораны и соавт. можно рассматривать как еще одно свидетельство в пользу рассматриваемой модели бактериородопсина.

Исследования с применением дифракции нейтронов [790, 850, 1346] показали, что ретиналь расположен внутри молекулы бактериородопсина (если смотреть на мембрану сверху) где-то между колоннами C—E, с одной стороны, и колоннами F и G — с другой (рис. 59,е).

3.5.3. Липиды бактериородопсиновых бляшек

В пурпурных бляшках бактериородопсин составляет около 75% вещества мембраны. Остальное — фосфо- и сульфолипиды и каротиноиды.

На один бактериородопсиновый тример в бляшке приходится примерно 30 молекул фосфо(сульфо)липидов, причем три из них располагаются в центре тримера, а остальные — между тримерами [610]. Все липиды относятся к классу терпенов, что характерно для многих бактерий-термофилов (*H. halobium* не только гало-, но и термофил). Возможно, что боковые метильные группы в разветвленных (терпеновых) углеводородах предотвращают слишком плотную упаковку липидов в мембране. В других случаях та же цель достигается присутствием ненасыщенных жирных кислот [706, 820].

Углеводородные цепи фосфолипидов галобактерий являются остатками жирных спиртов, а не жирных кислот. Следовательно, фосфолипиды этих микроорганизмов представляют собой простые эфиры, а не сложные. Роль жирного спирта играет дигидрофитол ($C_{20}H_{41}OH$) [820].

Липиды пурпурных бляшек, экстрагируемые смесью хлороформа и метанола, содержат фосфатидилглицерофосфат (около 52%), фосфатидилглицерин (4%), фосфатидилглицеросульфат (5%), гликолипидсульфаты (10%), триглюкозилдиэфир (19%), сквален и несколько других нейтральных липидов (9%).

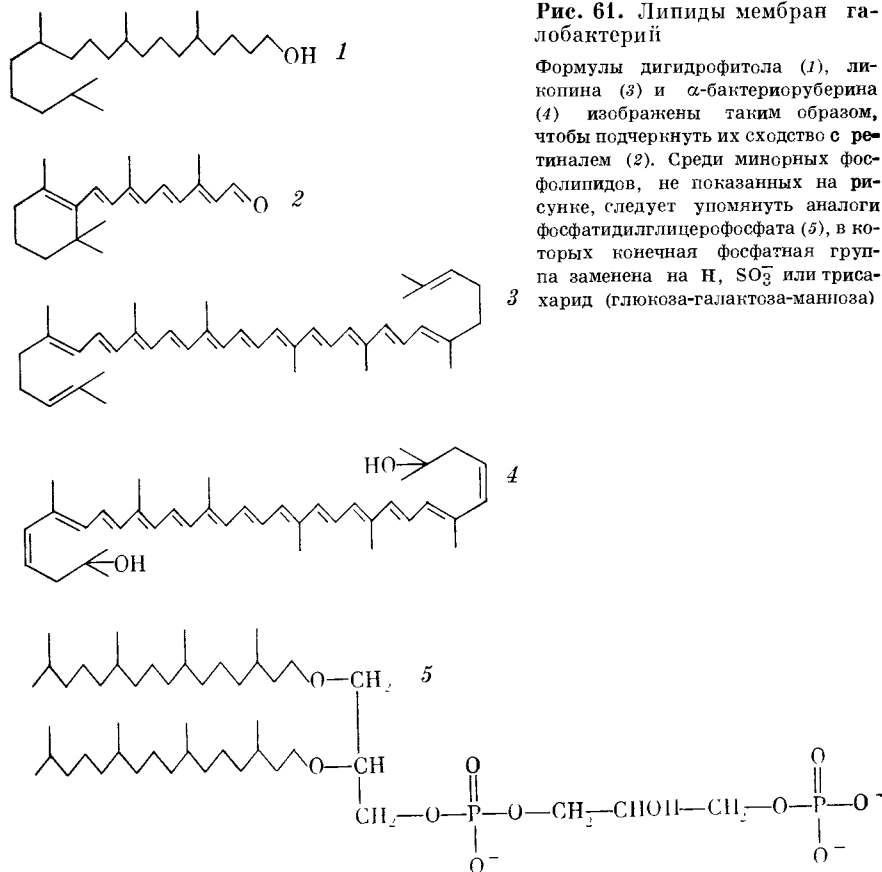
Следует отметить, что сульфолипиды и триглюкозилдиэфир специфичны для пурпурных бляшек и отсутствуют в других участках мембраны (так называемых красных мембранах), не содержащих бактериородопсина. В то же время красные мембраны (но не пурпурные бляшки) несут большое количество каротиноидов, в основном бактериоруберина, сообщаящего этим мембранам их цвет. Считается, что каротиноиды предохраняют галобактерии от вредоносного действия яркого света (см. обзоры: [706, 1456]). Липиды галобактерий приведены на рис. 61.

3.5.4. Организация бактериородопсиновой бляшки

Необычная для биомембран регулярность в упаковке белков и липидов пурпурных бляшек отмечена Блауроком и Стокениусом еще в 1971 г. [266]. Как показали измерения дифракции рентгеновских лучей, бляшка представляет собой правильно организованный двумерный кристалл с решеткой 6,3 нм. Кристалл построен из тримеров бактериородопсина (см. выше рис. 59,а).

Расчет профиля электронной плотности показал бислойную организацию с расстоянием около 4,0 нм между головками фосфолипидов. Приняв во внимание этот факт и модели структуры бактериородопсина, показанные на рис. 59, можно было бы предположить, что внешний и внутренний полумембранные слои построены по одному типу. Оказалось, однако, что это не так. Внешний листок мембраны совершенно гладкий, в то время как внутренний — шероховатый. Такую асимметрию можно было бы объяснить, исходя из предположения, что молекулы бактериородопсина сдвинуты в сторону цитоплазматической поверхности мембраны. Крайняя точка зрения предполагает, что весь бактериородопсин располагается во внутреннем листке, а внешний занимают фосфолипиды [27].

Измерения скорости вращения бактериородопсина в плоскости мембраны дали величину порядка 70 мс. Она соответствует теоретической, если принять, что молекулы бактериородопсина неподвижны, а вращается как единое целое вся бляшка диаметром около 0,5 мкм (см. обзор: [706]).



3.5.5. Фотоцикл бактериородопсина

Поглощение фотона бактериородопсином вызывает ряд превращений, замкнутых в цикл. Каждое из них может быть проследено по характерному спектральному сдвигу. Уже в 1971 г. Остерхельт и Стокениус [1126] описали ключевой интермедиат бактериородопсинового фотоцикла, поглощающий свет при гораздо более короткой длине волны (412 нм), чем исходная форма бактериородопсина (568 нм). Поскольку этот спектральный сдвиг подобен таковому в зрительном родопсине, а именно переходу родопсин → метародопсин II (MII), коротковолновый интермедиат бактериородопсина был назван M_{412} . В последующих работах были выявлены два интермедиата между бактериородопсином и M_{412} в фотоцикле [1457]. Они были обозначены буквами алфавита, предшествующими М. Образование M_{412} стали описывать следую-

щей схемой $bR \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M$, где bR — основное состояние бактериородопсина.

Было высказано предположение, что превращение M_{412} в bR также включает два промежуточных продукта ($M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow bR$). Однако дальнейшие исследования показали, что по крайней мере интермедиат N может быть исключен из основного пути. Что касается O, то остается неясным, всегда ли обязателен этот компонент для фотоцикла. Тем не менее O, как правило, фигурирует на схемах фотопревращений бактериородопсина (см. обзоры: [16, 459]).

Дальнейшее усложнение схемы фотоцикла стало необходимым после описания очень короткоживущих предшественников интермедиата K. Используя вспышки лазера длительностью 0,6 пс, А. В. Шарков и соавт. [1366] обнаружили, что bR сперва превращается в продукт с $\lambda_{\text{макс}}$ дифференциального спектра 460 нм, который, по всей видимости, представляет собой возбужденное состояние остатка ретиналя. Этот компонент, названный I, дает интермедиат J, превращающийся в K. Времена жизни I и J оказались соответственно порядка 0,7 и 3 пс (см. также [169, 477]).

В последнее время появились указания на то, что M есть сборное понятие, объединяющее два интермедиата [1455]. Может быть, два M участвуют в двух параллельных путях превращения продукта L.

А. Д. Кауленом в нашей лаборатории были описаны две формы бактериородопсина с максимумом поглощения в области 560—570 нм, отличающиеся молярными коэффициентами экстинкции. Форма бактериородопсина, имеющая меньшую экстинкцию и максимум поглощения, несколько сдвинутый в область коротких длин волн (около 560 нм), служит предшественником основной формы бактериородопсина в фотоцикле. Превращение нового интермедиата, названного Р, в основную форму bR , имеющую больший коэффициент молярной экстинкции, резко тормозится небольшими количествами тритона X-100 [500]. По данным Данчхази и соавт. [419], P_{560} имеет дополнительный максимум поглощения при 350 нм. Повышение pH и снижение температуры благоприятны для образования Р, которое, по-видимому, альтернативно образованию O. Отщепление хромофора от bR дает полностью *транс*-изомер ретиналя, в то время как та же процедура, примененная к M_{412} , имеет результатом 13-*цис*-изомер. Спектроскопия в инфракрасной и ультрафиолетовой областях свидетельствует о том, что 13-*цис*-ретиналь возникает на стадии фотоцикла не позже, чем интермедиат K [743, 1435].

Есть указания на некоторое светозависимое изменение конформации белковой части бактериородопсина при переходах $bR \rightarrow K$ и $K \rightarrow M$ [202, 459, 1383]. Эти изменения таковы, как если бы имели место поворот α-спиралей вокруг их длинной оси и изменение их наклона к плоскости мембраны [505—507].

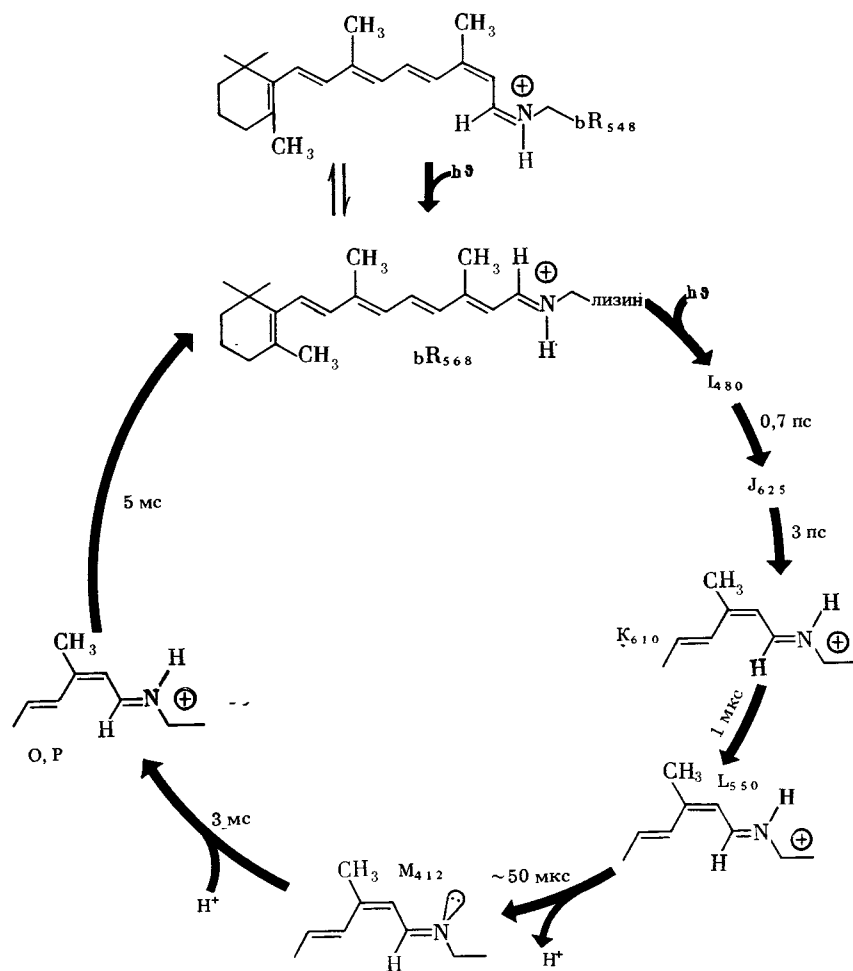


Рис. 62. Фотоцикл бактериородопсина

Исходный пигмент, т. е. светоадаптированный бактериородопсин (bR_{568}), содержит остаток полностью *транс*-ретиная, прикрепленный к Lys-216 через протонированное Шиффово основание. Поглощение света превращает bR_{568} в I , который затем вновь регенерирует bR_{568} . Процесс регенерации bR_{568} из I включает интермедиаты J , K , L , M и O или P . *Транс-цис*-изомеризация ретиная вокруг связи $C_{13}-C_{14}$ приводит к перемещению протонированного Шиффова основания из одного места в мембране в другое, что сопровождается запасанием энthalпии порядка 16 ккал/моль. На последующих тепловых стадиях эта энергия используется для трансмембранного переноса H^+ ($H^+_{внутр} \rightarrow H^+_{наруж}$). Переход $M \rightarrow O (P)$ сопровождается переносом H^+ с одной из протолитических групп белка на азот Шиффова основания. В темноте bR_{568} медленно превращается в bR_{548} , который содержит почти эквимольные количества полностью *транс*- и *13-цис*-ретиная. Индексы около букв означают максимумы поглощения пигментов (по: Смит и соавт. [1435] и Драчев и соавт. [500]).

Методом инфракрасной спектроскопии было показано, что азот Шиффова основания протонирован в bR и во всех интермедиатах, кроме M_{412} [459, 1435, 1456].

Хранение бактериородопсина в течение нескольких минут в темноте приводит к так называемой темновой адаптации. При этом около 50% молекул бактериородопсина превращается в новый компонент, поглощающий при 548 нм и содержащий *13-цис*-ретиная. Темноадаптированный bR_{548} неактивен как протонный насос. Освещение вызывает быстрый переход $bR_{548} \rightarrow bR_{568}$ (световая адаптация) [459, 678, 1456].

Один из вариантов фотоцикла бактериородопсина приведен на рис. 62.

3.5.6. Светозависимый транспорт протонов бактериородопсином

3.5.6.1. Корреляция фотоцикла, генерации $\Delta\psi$, освобождения и поглощения H^+

Прогресс в понимании функциональной активности бактериородопсина связан прежде всего с разработкой и одновременным применением быстрых спектральных и электрометрических методов, а также с использованием коротких вспышек лазера.

Спектральные измерения в максимумах интермедиатов фотоцикла позволяют следить за их образованием и распадом. Чувствительные pH-индикаторы дают возможность наблюдать выделение и поглощение ионов H^+ молекулами бактериородопсина, которые одновременно задействованы вспышкой света. Прямое измерение смещений зарядов в бактериородопсине, сорбированном на коллоидной пленке, дает информацию о переносе H^+ или каких-либо иных заряженных компонентов внутри молекулы ΔF -генератора.

На рис. 63 показаны результаты эксперимента, проведенного в нашей лаборатории Л. А. Драчевым и А. Д. Кауленом [58, 498]. В этом опыте измеряли следующие три параметра: 1) образование и распад M_{412} (по изменению поглощения света при 412 нм), 2) изменение pH в среде (по поглощению света pH-индикатором — *n*-нитрофенолом) и 3) генерацию и разрядку $\Delta\psi$, обусловленную смещением зарядов в бактериородопсине (по показаниям вольтметра, соединенного с двумя электродами, погруженными в растворы электролита по обе стороны коллоидной пленки). Однократное срабатывание бактериородопсина вызывали вспышкой лазера ($t_{1/2}$ вспышки — 15 нс). При измерениях сдвигов pH и поглощения при 412 нм использовали суспензию открытых (незамкнутых) пурпурных бляшек. Для измерения $\Delta\psi$ те же бляшки встраивали с одной стороны в коллоидный фильтр (см. выше раздел 2.1.2).

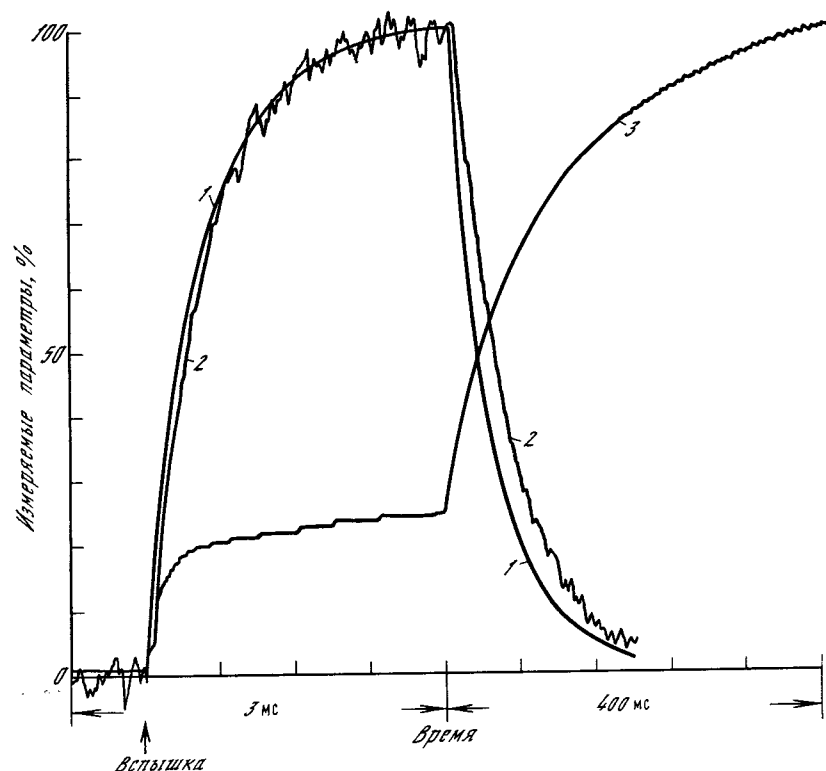


Рис. 63. Кинетика трех параметров, характеризующих работу бактериородопсина

1 — образование и распад интермедиата M_{412} ; 2 — поглощение и выделение H^+ незамкнутыми бактериородопсиновыми бляшками; 3 — генерация и рассеяние $\Delta\psi$ в системе бляшки—коллоидная пленка. Вертикальная стрелка обозначает момент лазерной вспышки ($\lambda_{\text{макс}} = 532 \text{ нм}$, $t_{1/2} = 15 \text{ нс}$). Условия: 100 mM NaCl , 1 mM Мес-буфер ($\text{pH } 6,8$), $t = 5^\circ$ (по: Драчев и соавт. [498])

Как видно из графика, кинетика образования и распада M_{412} совпадает соответственно с выделением и поглощением H^+ бляшками. Поскольку процессы образования M_{412} и выделения H^+ оказались намного быстрее ($t_{1/2}$ около 250 мкс), чем распад M_{412} и поглощение H^+ ($t_{1/2}$ порядка 30 мс), то их можно было легко соотнести с двумя основными электрогенными процессами, наблюдавшимися в системе бляшки—коллоидная пленка (приведенные выше величины $t_{1/2}$ относятся к температуре, равной 5° , при которой ставили этот опыт). Ясно, что образование M_{412} и выброс H^+ коррелируют с электрогенной фазой, развивающейся в микросекундной временной шкале. Соответственно распад M_{412} и поглощение H^+ коррелируют со второй (миллисекундной) электрогенной фазой. Заметим, что соотношение амплитуд микро-

и миллисекундных фаз генерации $\Delta\psi$ оказывается порядка $1 : 4$ [58, 498].

Измерение $\Delta\psi$ с большим временным разрешением позволило нам обнаружить еще одну электрогенную стадию ($t_{1/2} < 50 \text{ пс}$) [497]. Ее скорость была недавно измерена венгерскими биоэнергетиками. Она оказалась $30 \pm 10 \text{ пс}$ [651]. Стадия, о которой идет речь, очень мала по амплитуде. Она характеризуется направлением электрического вектора, противоположным таковому более медленных электрогенных стадий (см. ниже рис. 68).

Опыты на суббактериальных пузырьках показали, что освещение вызывает быстрое выделение ионов H^+ . Затем следует очень медленное поглощение выделенных H^+ -ионов. Поглощение резко ускоряется протонфорами, как если бы ионы H^+ черпались из водной фазы внутри пузырька. В то же время протеолипосомы, имеющие обратную ориентацию мембраны, в ответ на свет демонстрируют быстрое поглощение H^+ , после чего происходит медленное выделение этих ионов [633].

Описанные выше соотношения указывают, что трансмембранный перенос ионов H^+ бактериородопсином должен быть направлен из цитоплазмы в периплазму бактериальной клетки. В полном соответствии с этим выводом оказались результаты опытов на клетках, суббактериальных пузырьках, протеолипосомах и бляшках, сорбированных на коллоидной пленке. Было найдено, что микро- и миллисекундные электрогенные стадии имеют такое направление, как если бы положительные заряды переносились от цитоплазматической к периплазматической поверхности. Предшествующая им быстрая электрогенная фаза может объясняться небольшим сдвигом положительного заряда в противоположную сторону.

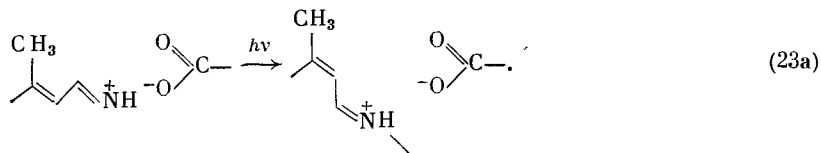
Еще один эффект важен для понимания рассматриваемого механизма. Это сдвиг pK Шиффова основания. В исходном состоянии бактериородопсина pK выше 11. Поглощение кванта света сдвигает pK к 3,5, что совпадает с переходом bR в M_{412} . Сказанное означает, что Шиффово основание, протонированное в темноте, под действием света должно терять протон, если pH среды выше 3,5.

3.5.6.2. Возможный механизм перекачки протонов

Приняв во внимание факты, перечисленные в предыдущем разделе, мы можем описать механизм работы бактериородопсина как процесс, состоящий из четырех основных стадий.

Стадия 1. Поглощение фотона остатком полностью транс-ретиналя вызывает его изомеризацию в 13-цис-ретиналь. Если полиеновая цепь ретиналя прочно фиксирована в молекуле белка, а Шиффово основание имеет возможность переместиться, то изомеризация должна вызвать такое перемещение. По-видимому,

изомеризация ретиналя имеет следствием перемещение Шиффова основания из окружения, благоприятного для его протонирования, в окружение, благоприятное для депротонирования. Такой эффект может возникать при удалении атома азота Шиффова основания от какой-нибудь отрицательно заряженной группы, например, ионизованного карбоксилата остатка аспартата, который, как думают, образует в bR_{568} солевую связь с Шиффовым основанием:



Движение протонированного Шиффова основания может быть измерено как электрогенный процесс (смещение заряда), если оно происходит не параллельно плоскости мембраны, а перпендикулярно или под углом к ней. Может быть, именно этот эффект обуславливает возникновение самой быстрой (обратной) электрогенной стадии в фотоэлектрическом ответе бактериородопсина.

Стадия 2. Шиффово основание, очутившись в новом месте, освобождает протон. Последний затем транспортируется к периплазматической поверхности мембраны по выходному H^+ -проводящему пути, который связывает эту поверхность с местом внутри молекулы белка, где локализовано Шиффово основание остатка 13-цис-ретиналя. Перенос H^+ по выходному пути дает микросекундную стадию фотоэлектрического ответа.

Стадия 3. Депротонированный остаток 13-цис-ретиналя переносится в исходное положение, протонируется какой-то протолитической группой белка и изомеризуется в полностью *транс*-изомер.

Стадия 4. Протолитическая группа репротонируется ионом H^+ , перенесенным по входному H^+ -пути. Этот путь соединяет цитоплазматическую поверхность мембраны с местом, где находится Шиффово основание. Перенос H^+ по входному пути обуславливает появление последней (миллисекундной) электрогенной стадии.

Приняв, что величины диэлектрических постоянных в областях выходного и входного путей сходны, можно заключить, что первый примерно вчетверо короче второго, поскольку соотношение амплитуд микро- и миллисекундных электрогенных стадий равно четырем. Поэтому Шиффово основание должно быть локализовано гораздо ближе к внешней поверхности мембраны, чем к внутренней (рис. 64). Этот вывод находится в хорошем соответствии с данными, полученными другими методами (см. раздел 3.5.2).

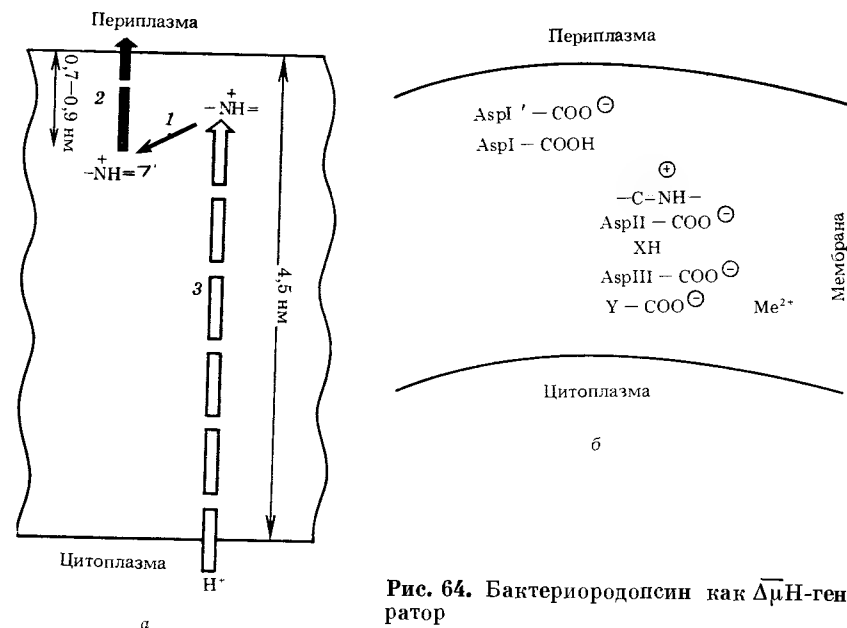


Рис. 64. Бактериородопсин как $\Delta\mu\text{H}$ -генератор

а — схема протонпроводящих путей; 1 — светозависимая изомеризация ретиналя из полностью *транс*- в 13-цис-форму, ведущая к перемещению протонированного азота Шиффова основания от конца входного протонпроводящего пути к началу выходного протонпроводящего пути; 2 — H^+ отщепляется от азота Шиффова основания и по выходному пути переносится к внешней поверхности мембраны. Затем происходит обратная (13-цис $\rightarrow$ полностью *транс*) изомеризация ретиналя, и депротонированное Шиффово основание возвращается в исходное положение, т. е. к концу входного канала (на схеме это показано); 3 — протонирование Шиффова основания ионом H^+ , перенесенным из цитоплазмы по входному пути;

— предполагаемые компоненты протонпроводящих путей в молекуле бактериородопсина: XH и $\text{Y}-\text{COO}^-$ — неизвестные протондонорные и протонакцепторные группы (вероятно, остатки тирозина и аспартата); Me^{2+} — ион металла, необходимый для работы бактериородопсина (по: Энгельгард и Хесс [534])

Чтобы объяснить как-то иначе наблюдаемое соотношение электрогенных стадий, необходимо дополнительное предположение, что проводимость выходного пути много больше таковой входного.

Механизм, показанный на рис. 64, — простейший из возможных. Его придется усложнить, если выяснится, что бактериородопсин переносит не один, а два протона на каждый поглощенный квант света. Некоторые указания в этом направлении можно найти в литературе [1141, 1247, 1457]. Однако, как показало специальное исследование, проведенное в нашей группе, такого рода «суперстехиометрия» оказалась результатом ошибки в расчетах [498].

Предложенная схема позволяет понять механизм ингибирования бактериородопсина кислым pH и ионами La^{3+} . Показано,

в частности, что как микро-, так и миллисекундные электрогенные стадии блокируются при подкислении среды ниже pH 3.5 [494]. Именно такой эффект можно ожидать, когда Шиффова основание (или какая-либо функциональная группа выходного пути) теряет способность отдавать протон. В то же время La^{3+} оказался специфическим ингибитором миллисекундной стадии, как если бы он блокировал входной путь. Таким же эффектом обладал Ca^{2+} , но при больших концентрациях [484, 493, 494]. Мы предположили, что действие La^{3+} и Ca^{2+} обусловлено связыванием этих катионов какими-то анионными группами на цитоплазматической поверхности мембраны, существенными для нативной конформации белка, необходимой при репротонировании Шиффова основания. Эта гипотеза была недавно подтверждена Синьоре и Риго [1347], показавшими, что La^{3+} тормозит работу бактериородопсина только в «вывернутых» протеолипосомах.

Остается неясным механизм переноса протона по H^+ -проводящим путям внутри мембраны. Это может быть эстафетная передача протона от одной протонакцепторной группы белка к другой или сдвиг протонов вдоль цепочки водородных связей, принадлежащих белку либо молекулам воды, сорбированным на белке и фосфо(сульфо)липидах пурпурной бляшки.

Было предпринято несколько попыток идентифицировать функциональные группы, участвующие в протонпроводящих путях. С этой целью использовались два подхода: 1) специфическая модификация либо удаление определенных аминокислотных остатков или их замена остатками других аминокислот и 2) измерение состояния функциональных групп аминокислот в интактном белке.

Сведения, полученные с использованием первого подхода, могут быть интерпретированы однозначно, если модификация, удаление или замена аминокислоты не влияют на транспорт H^+ . В таком случае можно с уверенностью сказать, что данный аминокислотный остаток не существен для функционирования системы транспорта протонов. Если же измененный бактериородопсин утрачивает способность перекачивать протоны, то мы оказываемся перед дилеммой: либо исследуемый остаток прямо участвует в транспорте H^+ , либо он необходим для поддержания нативной структуры транспортной системы.

Как показали опыты, проведенные нами совместно с Ю. А. Овчинниковым и его коллегами [148, 1148], удаление трех аминокислот с N-конца, 17 аминокислот с C-конца, а также пяти аминокислот (от Met-68 до Gly-72) из гидрофильной связки между α -спиралями В и С не влияет на транспорт протонов и кинетику отдельных электрогенных стадий. Впоследствии это наблюдение было подтверждено Кораной и соавт. [934]. Авторы не только расщепили бактериородопсин на два фрагмента (А—В и С—G), но и препаративно разделили эти фрагменты, а затем реконструировали в протеолипосомах. Полученная система была способна

к светозависимому переносу ионов водорода. Эти опыты показывают, что структура бактериородопсина столь сильно стабилизирована нековалентными взаимодействиями, что расщепления некоторых пептидных связей оказывается недостаточным, чтобы нарушить структуру протонного насоса. В поддержание этой структуры, по-видимому, вносит определенный вклад остаток ретиналя. Так, было найдено, что добавка ретиналя стабилизирует нативную конформацию бактериородопсина, реконструированного из А—В- и С—G-фрагментов полипептидной цепи [934]¹.

Многообещающим подходом к изучению функций отдельных частей молекулы бактериородопсина может быть направленный мутагенез. С этой целью Корана и соавт. [512, 951, 1008] выделили и клонировали ген бактериородопсина. Затем в нем были сделаны замены в единичных кодонах и осуществлен биосинтез модифицированных бактериородопсинов [666]. Выяснилось, что замена Lys-216 на Ala или Val предотвращает образование окрашенного продукта из бактериородопсина и ретиналя. Такой же эффект имели следующие одиночные замены: Asp-212 → Asn, Ala-215 → Lys, Val-213 → Lys и Tyr-185 → Phe. Не приходится удивляться, что замена Lys-216, к которому крепится ретиналь, делает невозможным образование пигмента. Что касается трех замен вблизи Lys-216, то они, по-видимому, как-то влияют на ближайшее окружение Шиффова основания. В частности, предполагается, что карбоксил Asp-212 образует солевую связь с протонированным азотом Шиффова основания (см. выше уравнение 23а).

Неясно, какова роль OH-группы Tyr-185, локализованного в колонне F. Было высказано предположение, что эта группа находится вблизи C_{13} -метила ретиналя, существенного для работы бактериородопсина (см. ниже).

¹ Возникает вопрос, несут ли вообще какую-либо функциональную нагрузку выставленные в воду терминальные последовательности бактериородопсина. В этой связи можно высказать следующее соображение. Мембрана существует только тогда, когда она состоит из компонентов, образующих гидрофобную сердцевину и гидрофильные поверхности раздела фаз. В фосфолипидах эти две функции выполняют соответственно углеводородные цепи жирных кислот и заряженные головки, содержащие фосфатный остаток. В пурпурных бляшках количество фосфолипидов слишком мало, чтобы образовать непрерывный бислой. Очевидно, что гидрофобная сердцевина бляшки образована α -спиральными колоннами бактериородопсина. Что касается гидрофильной части, то она может быть организована за счет аминокислотных последовательностей, экспонированных в воду. Пять из 17 аминокислотных остатков на C-конце бактериородопсина заряжены отрицательно, поскольку они содержат свободные карбоксильные группы, которые несомненно должны вносить свой вклад в создание поверхностного заряда на цитоплазматической стороне бляшки. Показательно, что удаление обращенных в воду участков бактериородопсина при обработке протеиназой резко повышает тенденцию бляшек к агрегации [1148].

Было также показано [666], что замена Trp-189 на Phe вызывает изменение спектра поглощения бактериородопсина. Следующие замены никак не влияют на его спектральные характеристики: Ser-193 → Ala, Glu-194 → Gln, Ile-203 → Leu. К сожалению, способность этих аналогов бактериородопсина переносить протоны осталась неисследованной.

Есть указания, что Trp-26 и Trp-64 необходимы для транспорта H^+ . Их химическая модификация тормозит активность бактериородопсина (см. обзор: [459]). Ротшильд и соавт. [1271] измерили инфракрасные дифференциальные спектры бактериородопсина с изотопно мечеными тирозинами. Полученные данные указывают на протонирование ионизованной группы тирозина (тирозината) при переходе bR → K (см., однако, [535]). Ю. А. Овчинниковым и соавт. [100] показано, что один из остатков тирозина участвует в образовании интермедиата М.

Рассматривая возможные варианты укладки полипептидной цепи бактериородопсина, не удастся избежать ситуации, когда несколько заряженных аминокислотных остатков оказываются в гидрофобной части мембраны. В то же время в комплексе реакционных центров Rps. viridis все такие остатки располагаются на поверхностях раздела мембрана/вода (см. раздел 3.1.2).

Объяснение этого различия двух ДН-генераторов может состоять в том, что комплекс реакционных центров переносит через мембрану электрон, а бактериородопсин — протон. Двигаясь поперек мембраны по комплексу реакционных центров, электрон перескакивает с одной простетической группы на другую. В бактериородопсине такого рода эстафетный механизм должен переносить протон. В этом процессе могли бы участвовать заряженные аминокислотные остатки.

Наблюдения, сделанные в лабораториях Хесса и Зиберта [533], свидетельствуют об участии нескольких (предположительно четырех) карбоксильных групп в переносе протонов бактериородопсином. В этой работе авторы также использовали дифференциальную спектроскопию в инфракрасной области. В качестве объекта исследования служил бактериородопсин с $[4-C^{13}]$ -аспартатами. Сопоставив кинетику протонирования—депротонирования аспартатных карбоксилатов со скоростями взаимопревращения интермедиатов фотоцикла, Энгельгард и Хесс [534] предложили схему протонпроводящих путей в молекуле бактериородопсина, показанную на рис. 64, б. Судя по нашим данным [500], переход $M \rightarrow P$ обусловлен внутримолекулярным переносом H^+ от какой-то протолитической группы бактериородопсина (на рис. 64, б это ХН) к Шиффову основанию, а переход $P \rightarrow bR$ есть следствие протонирования Х цитоплазматическими ионами H^+ .

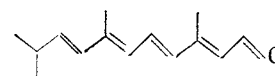
Независимые исследования в нескольких группах продемонстрировали, что для своей активности бактериородопсин требует ион металла. Природа металла оказалась не существенной на

качественном уровне. Количественно более эффективными были трехвалентные ионы (константа диссоциации ниже 10^{-5} М, в то время как для одновалентных ионов эта величина была больше 10^{-3} М). Было показано, что реактивация бактериородопсина может быть достигнута добавлением всего одного иона металла на молекулу деионизованного бактериородопсина. Высказано предположение, что природными катионами-активаторами служат Mg^{2+} и Ca^{2+} [364, 515, 849, 867].

Были предприняты попытки выяснить, каковы требования к хромофору (ретинолу). Оказалось, что удаление метильной группы в 13-м положении ретиналя полностью тормозит активность бактериородопсина как протонного насоса. При этом из электрогенных стадий остается только первая (отрицательная) [595]. 9-Цис-, 11-цис- и 9, 13-ди-цис-ретинолы, а также аналог полностью транс-ретинола с полиеновой цепью, удлиненной на одну изопреновую группу, не связываются с бактериородопсином. Это же верно для производного ретиналя с лишней метильной группой в 14-м положении [214, 1456].

Следующие изменения в ретиноле не предотвращают присоединения хромофора: удаление метильных групп в 5-м и 9-м положениях, замена метила в 13-м положении на этил или фенил, насыщение двойной связи в иононовом кольце, замена этого кольца на фенил или нафтил, введение групп $-OH$ или $=O$ в 4-м положении, эпоксигруппы в положениях 5, 6, а также метоксигруппы или метила в положениях 3 и 2 [53, 214, 763, 1419, 1456].

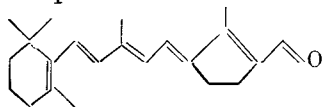
Светозависимое образование интермедиата М и сопутствующие ему изменения pH были показаны Кроучем и соавт. [414, 1650] для бактериородопсина со следующим аналогом ретиналя, лишним иононовым кольцом:



Все аналоги ретиналя, дающие активный пигмент, образовывали при добавлении к бактериородопсину окрашенный продукт с максимумом >450 нм, напоминая в этом отношении нативный ретинол. Однако квантовый выход образования интермедиата М в ряде случаев оказался гораздо ниже 0,6 (эта величина характерна для природного бактериородопсина [1125]). Такой эффект имел место, например, для 4-кето- или 5,6-эпокси-ретиналей [53]. Неудивительно поэтому, что 5,6-эпокси-ретиналь был не способен стимулировать фотофосфорилирование, будучи добавленным вместо ретиналя к клеткам H. halobium, выращенным в условиях, когда ретинол не мог образовываться естественным путем [1124].

Чанг и соавт. [365] получили аналог бактериородопсина из бактериородопсина и фиксированного аналога полностью

транс-ретиная:



Он имел максимум поглощения при 576 нм. Фотоцикл и способность переносить протоны отсутствовали. Это наблюдение свидетельствует о том, что транс-цис-изомеризация существенна для фотоцикла и сопряженного с ним транспорта протонов.

3.5.7. Бактериородопсин в темноте.

Проблема утечки протонов

Как уже отмечалось выше, выдерживание бактериородопсина в темноте вызывает медленное ($t_{1/2} = 20$ мин) спонтанное превращение полностью транс-ретиная в 13-цис-ретиная примерно в 50% молекул бактериородопсина. Это означает, что в среднем одна или две молекулы бактериородопсина в каждом из тримеров содержат 13-цис-ретиная. Темноадаптированный бактериородопсин с 13-цис-ретиналем имеет максимум поглощения при 548 нм. При поглощении фотона bR_{548} превращается в bR_{568} . Этот переход не сопряжен с переносом H^+ через мембрану. По спектру резонансного комбинационного рассеяния компонент bR_{548} отличается от всех описанных интермедиатов бактериородопсинового фотоцикла [349, 1435].

Биологический смысл темновой адаптации остается неясным. Он мог бы состоять, например, в снижении проводимости протонпроводящих путей, пронизывающих молекулу бактериородопсина. Эти пути, необходимые для функционирования белка на свету, могут оказаться вредными в темноте, когда бактериородопсин бездействует, а функцию генерации ДФН берет на себя дыхательная цепь. Если молекулы бактериородопсина, занимающие значительную часть площади мембраны *H. halobium* (иногда более 50%), в темноте сохраняют свои H^+ -проводящие пути, образованная дыханием ДФН может быть снижена за счет утечки протонов по этим путям. Такого эффекта можно было бы избежать, если бы темновая адаптация сопровождалась реорганизацией структуры бактериородопсина, которая препятствовала бы проведению протонов по H^+ -путям в нефункционирующем белке. Одна из возможностей состоит в том, что для упомянутой реорганизации бактериородопсина в темноте достаточно превращение в форму bR_{548} только одной из трех молекул бактериородопсина в тримере.

Альтернативный механизм, препятствующий проведению протонов бездействующим бактериородопсином, мог бы состоять в том, что H^+ -пути организуются в процессе фотоцикла. Для этого достаточно, например, небольшого поворота α -спиральных

колонн вокруг своей оси, сопровождающегося временным сближением закрепленных на них протондонорных и протонакцепторных групп. Есть ряд экспериментальных указаний, что α -спирали действительно как-то меняют свое положение по ходу фотоцикла [202, 459, 505, 507, 1383].

Рассматриваемая проблема имеет общее значение. В любом ДФН-генераторе внутреннее сопротивление должно быть низким в момент работы и высоким, когда он не функционирует. В противном случае встраивание ДФН-генератора в мембрану резко уменьшало бы толщину изолирующего слоя мембраны, пронизанной H^+ -проводящими путями. Это сильно увеличило бы вероятность электрического пробоя мембраны, несущей $\Delta\psi$ порядка 200 мВ. При толщине изолирующего слоя в 5,0 нм напряженность электрического поля в мембране оказывается $100 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$. Расчеты показывают, что перемещение Шиффова основания при цис-транс-изомеризации ретиная может обеспечить перенос протона на расстояние, меньшее, чем 10% толщины мембраны. Остальное расстояние (более 90%) пересекают H^+ -проводящие пути. Если эти пути постоянно проникаемы для H^+ , то напряженность поля между концом входного пути и началом выходного должна составлять более $1000 \text{ кВ} \times \text{см}^{-1}$. Вряд ли биологическая структура способна выдерживать такие напряжения в течение длительного времени без риска пробоя.

3.5.8. Другие ретинальсодержащие белки

Существует несколько хромопротеидов, содержащих ретиналь и выполняющих функции иные, чем генерация ДФН. Тем не менее те из ретинальсодержащих белков, которые уже были испытаны на предмет электрогенной активности, оказались способными генерировать значительную $\Delta\psi$ под действием света. Ниже мы кратко рассмотрим некоторые из этих систем, чтобы сравнить их с бактериородопсином.

3.5.8.1. Галородопсин

Галородопсин представляет собой ретинальсодержащий белок, транспортирующий ионы Cl^- из среды в клетку *H. halobium* за счет энергии света. Первое указание на то, что *H. halobium* располагает, помимо бактериородопсина, еще одним светозависимым ионным насосом, было получено Мацуно-Яга и Мукохатой [998]. Было высказано предположение, что галородопсин переносит ионы Na^+ из клетки в среду. Однако позднее Шоберт и Лани [905, 906, 1328] продемонстрировали, что транспортируемым ионом служит не Na^+ , а Cl^- , поглощаемый бактериальной клеткой.

Галородопсин — мембранный белок с молекулярной массой 27 кДа, т. е. того же порядка, что и у бактериородопсина. По

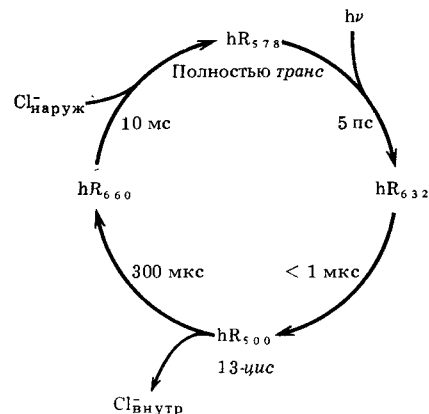


Рис. 65. Фотоцикл галородопсина (hR) (по: Стокениус [1454])

сдвигает максимум к 578 нм [1129, 1496]. Освещение дает интермедиат, поглощающий при 640 нм в отсутствие Cl^- и при 500 нм в его присутствии. Квантовый выход образования интермедиата равен 0,35 [1125]. Фотоцикл (рис. 65) включает изомеризацию полностью *транс*-ретиная в 13-*цис*-изомер [905]. Присутствие Cl^- замедляет фотоцикл [1123]. В процессе фотоцикла Шиффово основание все время остается протонированным [1122]. Темноадаптированный галородопсин содержит полностью *транс*- и 13-*цис*-ретинали в соотношении 82 : 18 [1129].

Включение галородопсина в протеолипосомы позволяет получить пузырьки, способные к светозависимому транспорту ионов хлора [276]. Будучи сорбированными на плоской бимолекулярной мембране, протеолипосомы генерируют фототок, обусловленный электрогенным транспортом ионов Cl^- [247].

В мембране галобактерии галородопсин локализован вне пурпурных блишек. Его насыщается около 20 тыс. молекул на клетку (примерно в 100 раз меньше, чем бактериородопсин). Чтобы выделить галородопсин, используют мутанты *H. halobium*, не содержащие бактериородопсина. Галородопсин гораздо лабильнее, чем бактериородопсин. Например, он инактивируется *in vitro* при понижении ионной силы раствора (см. обзоры: [459, 1454]).

Механизм действия галородопсина остается совершенно неясным. Одна из гипотез [1122] предполагает, что Cl^- связывается с положительно заряженным азотом протонированного Шиффова основания, а изомеризация ретиная вызывает перемещение этого азота с сидящим на нем ионом Cl^- от входного к выходному Cl^- -проводящему пути. В рамках этой схемы можно объяснить, каким образом близкие по свойствам молекулярные устройства

аминокислотным последовательностям два белка различаются примерно на 70%, причем наибольшее сходство наблюдается в составе α -спиральных колонн, число которых в галородопсине, как и в бактериородопсине, равно 7 [531, 1123]. Ретиналь крепится к галоопсину протонированным Шиффовым основанием. Раман-спектр галородопсина очень напоминает таковой бактериородопсина [971, 1122].

Максимум поглощения основной формы галородопсина располагается около 569 нм в отсутствие Cl^- . Добавление Cl^-

используются для переноса H^+ и Cl^- . Сравнивая гало- и бактериородопсины, следует иметь в виду, что до сих пор строго не доказано, что бактериородопсин переносит H^+ , а не OH^- . Нельзя исключить, что оба родопсина служат анионными помпами, накачивающими в клетку ионы OH^- и Cl^- .

Биологическая функция галородопсина состоит прежде всего в том, чтобы возвращать в клетку ионы Cl^- , электрофоретически выбрасываемые из цитоплазмы, заряженной отрицательно относительно внешней среды благодаря работе ДФН-генераторов: бактериородопсина и дыхательной цепи. Определенная утечка Cl^- неизбежна, если учесть, что $\Delta\psi$ на мембране галобактерий достигает 200 мВ, а концентрация Cl^- в цитоплазме очень высока (до 4 М).

По Вагнеру и соавт. [516], галородопсин ответствен за возврат меньшей части теряемых клеткой ионов хлора. Большая их часть возвращается, по-видимому, посредством Cl^- , H^+ -симпортера, локализованного в той же мембране. Обе эти системы могут также обеспечивать увеличение количества ионов Cl^- при возрастании объема клетки перед делением [1123].

3.5.8.2. Сенсорный родопсин и фобородопсин галобактерий

Галобактерии воспринимают красный свет как аттрактантный сигнал, а синий — как репеллентный. На штамме *H. halobium*, исследованном в нашей лаборатории [23, 228], было показано, что аттрактантный эффект красного света достаточно большой интенсивности в основном связан с протон-транспортной активностью бактериородопсина. Механизм этого эффекта состоит, по всей вероятности, в следующем. На свету бактериородопсин образует ДФН. Повышение ДФН регистрируется клеткой посредством особой ДФН-сенсорной системы, названной нами протометром (см. ниже раздел 6.1.5), которая посылает аттрактантный сигнал H^+ -моторам жгутиков. Таким образом, бактериородопсин, не являясь специализированным фотосенсором, тем не менее участвует в восприятии света как аттрактантного стимула, если интенсивность света достаточно велика, чтобы привести в действие большое количество молекул бактериородопсина. Неудивительно поэтому, что выключение не зависящих от света ДФН-генераторов (дыхания — цианидом, H^+ —АТФазы—ДЦКД) резко увеличивает ответ галобактерий на интенсивный аттрактантный свет. Этот эффект отсутствует у штамма, лишённого бактериородопсина [23].

Другие механизмы обеспечивают аттрактантное и репеллентное действие низких интенсивностей света. Роль фотосенсоров в этом случае выполняют ретинальсодержащие пигменты, названные сенсорным (или медленным) родопсином (sR) и фобородопсином (pR).

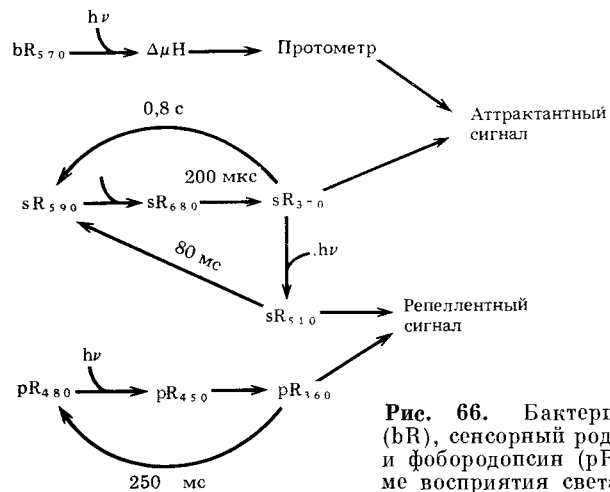


Рис. 66. Бактериородопсин (bR), сенсорный родопсин (sR) и фобородопсин (pR) в системе восприятия света галобактериями

Сенсорный родопсин был открыт Богомольным, Спудиком и др. [275, 1474] и Цудой и соавт. [1527] в штаммах *H. halobium* без бактериородопсина. sR имеет максимум при 590 нм, который сдвигается к 370 нм под действием света, вызывающего переход полностью *транс*-ретиная в *13-цис*-ретиная. Освещение sR₃₇₀ вызывает регенерацию формы sR₅₉₀ [1528]. В темноте это превращение также имеет место, но требует около 1 с, что примерно в 100 раз медленней, чем аналогичный процесс в бактериородопсине и галородопсине. По-видимому, образование долгоживущего продукта необходимо для того, чтобы включить цепь событий, приводящих к усилению аттрактантного сигнала.

Как показали опыты [1443, 1480], слабый длинноволновый свет сенсибилизирует клетки *H. halobium* к репеллентному действию коротковолнового света. Этот эффект был объяснен в рамках схемы, принимающей, что sR₃₇₀, получающийся из sR₅₉₀, служит сенсором синего света (рис. 66).

Другая точка зрения состояла в том, что репеллентное действие коротковолнового света обусловлено участием особого пигмента (P-370), не имеющего отношения к sR. Это предположение основывалось на опытах, в которых при определенных условиях роста бактерий удалось обнаружить появление репеллентного ответа на синий свет в отсутствие аттрактантного ответа на красный [717].

Дальнейшие исследования показали, что галобактерии действительно располагают четвертым ретинаясодержащим белком, не идентичным bR, hR и sR и участвующим наряду с sR в осуществлении репеллентного эффекта коротковолнового света. Однако его спектральный максимум располагается не при 370 нм,

а при 480 нм. Пигмент, названный фобородопсином (pR), при освещении превращается в интермедиаты с максимумами при 450 нм и 360 нм. Последний живет около 0,5 с. По-видимому, он и посылает репеллентный сигнал в систему таксиса [1479, 1621].

При выращивании галобактерий в условиях высокой аэрации P₄₈₀ оказывается единственным ретинаясодержащим белком. Снижение концентрации O₂ ведет к появлению трех других пигментов. Интересно, что все четыре ретинаясодержащих белка *H. halobium* используют один и тот же первичный светозависимый механизм, а именно полностью *транс*→*13-цис*-изомеризацию ретиная [1123, 1621, 1479].

Концентрация и локализация sR и, по-видимому, pR в мембране подобны таковым для галородопсина: это минорные компоненты, находящиеся в тех областях мембраны, где нет бактериородопсина. Одна клетка содержит около 5 тыс. молекул sR. Содержание pR оценивается величиной того же порядка (см. обзоры: [459, 1443, 1444, 1454]).

Как показали расчеты, сенсорный родопсин должен быть связан с какой-то мощной системой амплификации сигнала, поскольку для аттрактантного эффекта достаточно 20 квантов света, а для репеллентного — и того меньше (1—2 кванта света) [1443].

Недавно пигменты типа hR и pR были обнаружены у галоалкалофильных архебактерий *Natronobacter* и *Natronococcus*. Бактериородопсин и sR отсутствовали [259].

3.5.8.3. Животный родопсин

Животный, или зрительный, родопсин, открытый за сто лет до бактериального, служит светочувствительным пигментом фоторецепторных клеток глаза. Он ответствен за поглощение световых квантов и включение системы обработки светового сигнала.

Бычий родопсин содержит 348 аминокислотных остатков, что на сто остатков больше, чем у бактериородопсина. Аминокислотная последовательность этого белка, расшифрованная Ю. А. Овчинниковым, Н. Г. Абдулаевым и соавт. [101, 102, 147, 1146] (рис. 67), резко отлична от таковой бактериородопсина, тем не менее хорошо подходит для формирования структуры с семью α-спиральными колоннами, пронизывающими мембрану. Семь гидрофобных последовательностей той же протяженности, как в бактериородопсине, связаны гидрофильными последовательностями разной длины. Дополнительные сто аминокислот, упомянутые выше, локализованы в более длинных, чем у бактериородопсина, концевых последовательностях, а также в связках между колоннами. Особенно велика петля между пятой и шестой колоннами.

Кроме весьма вероятной «семиколонной» организации мембранной части белка, бактериальный и животный родопсин имеют

20 Ac-Met-Asn-Gly-Thr-Glu-Gly-Thr-Pro-Asn-Phe-Tyr-Val-Pro-Phe-Ser-Asn-Lys-Thr-Gly-Val-Val
 40 Arg-Ser-Pro-Phe-Glu-Ala-Pro-Gln-Tyr-Tyr-Leu-Ala-Glu-Pro-Trp-Gln-Phe-Ser-Met-Leu
 60 Ala-Ala-Tyr-Met-Phe-Leu-Leu-Ile-Met-Leu-Gly-Phe-Pro-Ile-Asn-Phe-Leu-Leu-Tyr-Tyr
 80 Val-Thr-Val-Gln-His-Lys-Lys-Leu-Arg-Thr-Pro-Leu-Asn-Tyr-Ile-Leu-Leu-Asn-Leu-Ala
 100 Val-Ala-Asp-Leu-Phe-Met-Val-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Thr-Leu-Tyr-Thr-Ser-Leu-His
 120 Gly-Tyr-Phe-Val-Phe-Gly-Pro-Thr-Gly-Cys-Asn-Leu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ala-Thr-Leu-Gly
 140 Gly-Glu-Ile-Ala-Leu-Trp-Ser-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ile-Glu-Arg-Tyr-Val-Val-Cys
 160 Lys-Pro-Met-Ser-Asn-Phe-Arg-Phe-Gly-Glu-Asn-His-Ala-Ile-Met-Gly-Val-Ala-Phe-Thr
 180 Trp-Val-Met-Ala-Leu-Ala-Cys-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Val-Gly-Trp-Ser-Arg-Tyr-Ile-Pro
 200 Glu-Gly-Met-Gln-Cys-Ser-Cys-Gly-Ile-Asp-Tyr-Thr-Pro-His-Glu-Glu-Thr-Asn-Asn
 220 Glu-Ser-Phe-Val-Ile-Tyr-Met-Phe-Val-Val-His-Phe-Ile-Ile-Pro-Leu-Ile-Val-Ile-Phe
 240 Phe-Cys-Tyr-Gly-Gln-Leu-Val-Phe-Thr-Val-Lys-Glu-Ala-Ala-Gln-Gln-Glu-Ser
 260 Ala-Thr-Thr-Gln-Lys-Ala-Glu-Lys-Glu-Val-Thr-Arg-Met-Val-Ile-Ile-Met-Val-Ile-Ala
 280 Phe-Leu-Ile-Cys-Trp-Leu-Pro-Tyr-Ala-Gly-Val-Ala-Phe-Tyr-Ile-Phe-Thr-His-Gln-Gly
 300 Ser-Asp-Phe-Gly-Pro-Ile-Phe-Met-Thr-Ile-Pro-Ala-Phe-Phe-Ala-Lys-Thr-Ser-Ala-Val
 320 Tyr-Asn-Pro-Val-Ile-Tyr-Ile-Met-Met-Asn-Lys-Gln-Phe-Arg-Asn-Cys-Met-Val-Thr-Thr
 340 Leu-Cys-Cys-Gly-Lys-Asn-Pro-Leu-Gly-Asp-Asp-Glu-Ala-Ser-Thr-Thr-Val-Ser-Lys-Thr
 348 Glu-Thr-Ser-Gln-Val-Ala-Pro-Ala-OH

еще целый ряд общих структурных особенностей. 1. N- и C-концы полипептидной цепи находятся по разные стороны мембраны. 2. N-конец блокирован. 3. Ретиналь присоединен к белку через ε-аминогруппу лизина (у животного родопсина это Lys-296), локализованного в ближайшей к C-концу (седьмой) α-спирали. (Однако в животном родопсине, в отличие от бактериального, ретиналь расположен, по-видимому, ближе к цитоплазматической поверхности мембраны [1].) 4. Шиффово основание в темноте протонировано и т. д. [1446, 1467]. Первые этапы фотоцикла также подобны в двух родопсинах. В обоих случаях были описаны следующие последовательные спектральные сдвиги: а) очень быстрый (пикосекундный) длинноволновый сдвиг, б) его обращение в микросекундной шкале и в) более медленный сдвиг в коротковолновую область спектра. Как в бактериальном, так и в животном родопсинах происходит светозависимая изомеризация ретиналя, однако вместо полностью *транс* → 13-*цис*-изомеризации, описанной у галобактерии, в случае зрительного пигмента имеет место переход 11-*цис* → полностью *транс* (см. обзоры: [130, 1412]).

Животный родопсин, подобно бактерио- и галородопсинам, оказался способным к генерации ΔΨ за счет энергии света [24, 25, 130, 240, 338, 491, 492, 940, 941, 1412, 1519, 1520].

Детальное сравнение электрогенных свойств животного и бактериального родопсинов, сорбированных на коллоидной пленке, было проведено нашей группой совместно с лабораторией М. А. Островского [130, 492, 1412]. Опыты выявили следующие черты сходства двух родопсинов (некоторые из них иллюстрируются рис. 68): 1) первая вспышка лазера вызывает генерацию ΔΨ значительной величины (> 30 мВ); 2) электрогенный процесс включает противоположно направленные стадии переноса заряда, причем более быстрая стадия ($\tau < 50$ нс) имеет гораздо меньшую амплитуду, чем более медленная; 3) главная электрогенная стадия развивается в миллисекундной шкале и сопровождается поглощением иона H^+ из среды; 4) направление фотопотенциала, образуемого на медленной стадии, таково, что отрицательно заряжается та поверхность мембраны, куда экспонирован C-конец полипептидной цепи белка; 5) разряд фотопотенциала в темноте занимает около секунды; 6) освещение коротковолнового интермедиата фотоцикла образует потенциал противоположного направления; 7) отщепление гидрофильных участков молекулы белка протеолизом не снимает фотоэлектрической активности той части полипептида, которая остается в мембране.

Функциональные различия животного и бактериального пигментов связаны главным образом с судьбой коротковолнового интермедиата (M_{II} или M_{412}).

Рис. 67. Аминокислотная последовательность бычьего родопсина (по: Овчинников [1446])

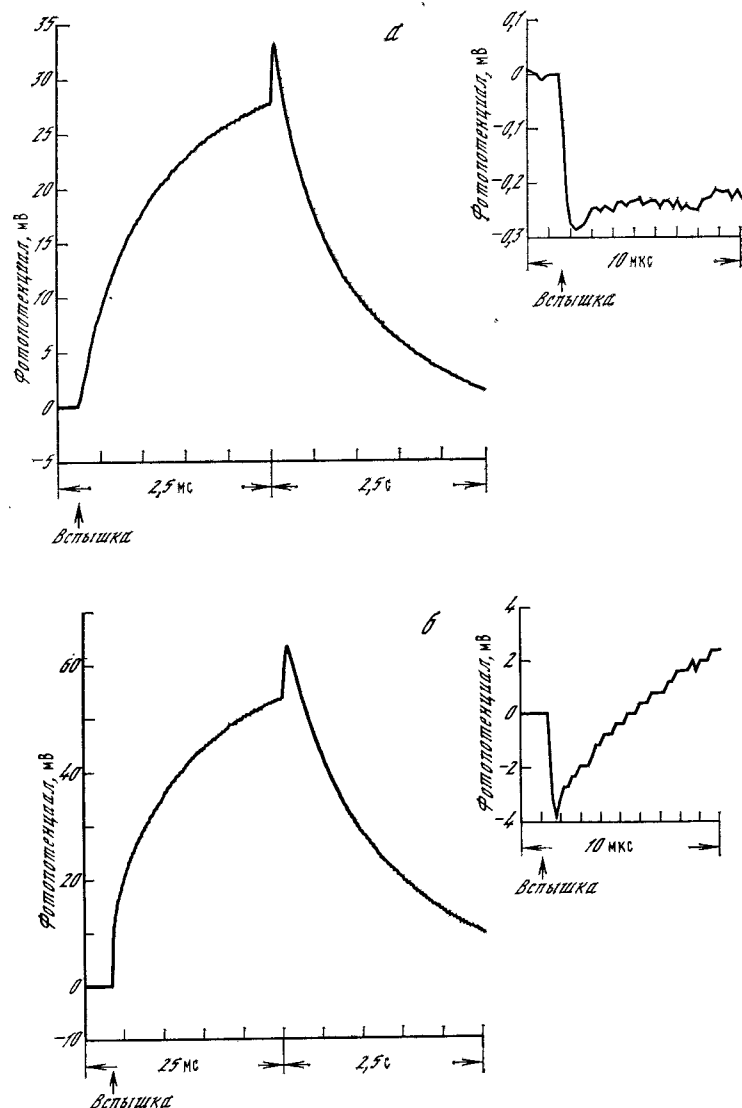


Рис. 68. Генерация фотоэлектрических потенциалов животным родопсином (а) и бактериородопсином (б)

Были фоторецепторные диски (а) или пурпурные бляшки из *H. halobium* (б) сорбировали на коллоидной пленке, пропитанной раствором фосфолипидов в декане. $\Delta\psi$ измеряли двумя электродами, помещенными в растворы по обе стороны пленки. Вертикальная стрелка означает вспышку лазера ($t_{1/2} = 15$ нс) (по: Драчев и др. [492, 494])

1. Образование этого интермедиата, в обоих случаях сопровождающееся депротонированием Шиффова основания, приводит к выделению H^+ в воду бактериальным, но не животным родопсином.

2. В случае животного родопсина интермедиат М II живет минуты. Время жизни бактериородопсинового M_{412} измеряется миллисекундами.

3. М II не может спонтанно превращаться в исходную форму родопсина. Он распадается на свободный полностью *транс*-ретиаль и опсин, который требует 11-*цис*-ретиаль, чтобы регенерировать родопсин.

4. Родопсин, превратившись в М II, приобретает способность специфически взаимодействовать с другим белком, названным трансдуцином.

Такое взаимодействие приводит к замене GDP, связанного с трансдуцином, на GTP. Это событие имеет следствием следующие процессы. Комплекс трансдуцин·GTP активирует фосфодиэстеразу, расщепляющую cGMP. В результате снижается концентрация cGMP и закрываются Na^+ -каналы плазматической мембраны, требующие cGMP в качестве активатора [558]. Закрытие каналов повышает сопротивление этой мембраны, что, в свою очередь, ведет к повышению $\Delta\psi$. Последняя постоянно генерируется $Na^+ / K^+ - АТФазой$ (см. обзоры: [822, 1412]).

Следует отметить, что цепь событий, описанная выше, очень напоминает таковую при действии гормонов на клетку-мишень. Например, адреналин, соединяясь с белком— β -рецептором в плазматической мембране определенных типов клеток, вызывает замену GDP на GTP в так называемом G-белке, функциональном аналоге трансдуцина. Комплекс G-белок·GTP активирует один из ферментов, имеющих дело с внутриклеточными медиаторами гормонального сигнала. В случае β -рецептора этим ферментом служит аденилатциклаза, образующая cAMP из АТФ. Образованный cAMP воздействует на протеинкиназы, регулирующие группу ферментов внутри клетки [220].

Другим хорошо известным медиатором гормональных сигналов служит ион Ca^{2+} . Например, тот же адреналин, влияя на α -рецепторы плазматической мембраны, вызывает в одних тканях открытие Ca^{2+} -каналов в этой мембране и поступление Ca^{2+} из межклетника в цитоплазму, а в других тканях — гидролиз фосфатидилинозитдифосфата (PIP_2) на диацилглицерид и инозиттрифосфат (IP_3). Последний открывает Ca^{2+} -каналы во внутриклеточных кальциевых депо (см. раздел 7.5). В цитозоле ионы Ca^{2+} взаимодействуют с особым Ca^{2+} -связывающим белком кальмодулином, который, будучи в комплексе с Ca^{2+} , изменяет активность определенных ферментов.

В зрении роль стимула играет не молекула гормона, а квант света, причем родопсин служит белком-рецептором. Здесь также есть свидетельство того, что не только циклический нуклеотид,

но и ион Ca^{2+} может как-то участвовать в рецепции стимула (света) или в адаптации клетки к действию стимула (см. обзоры: [40, 130, 1412]). Недавно был опубликован целый ряд указаний на участие фосфатидилинозитной системы в фоторецепции животных [313, 314, 551, 696, 817, 1360, 1549, 1571, 1640].

Предполагается, что все эти системы необходимы для размножения (амплификации) светового сигнала. Например, в более изученном cGMP-пути есть по крайней мере два этапа амплификации: 1) одна молекула долгоживущего интермедиата М II способна заменить GDP на GTP в сотнях молекул трансдуцина; 2) одна молекула активного тройного комплекса фосфодиэстераза-трансдуцин-GTP успевает расщепить сотни молекул cGMP, пока связанный GTP не гидролизуются до GDP и фосфата, что приводит к развалу комплекса. Приняв во внимание все эти обстоятельства, мы можем объяснить, каким образом клетке палочки удается отвечать возбуждением на такую минимальную порцию световой энергии, как одиночный фотон.

Однако амплификация сигнала становится ненужной и даже вредной, когда световой сигнал содержит не один, а, например, 10^5 фотонов. В этом случае желательно было бы иметь систему, линейно отвечающую на изменение светового потока.

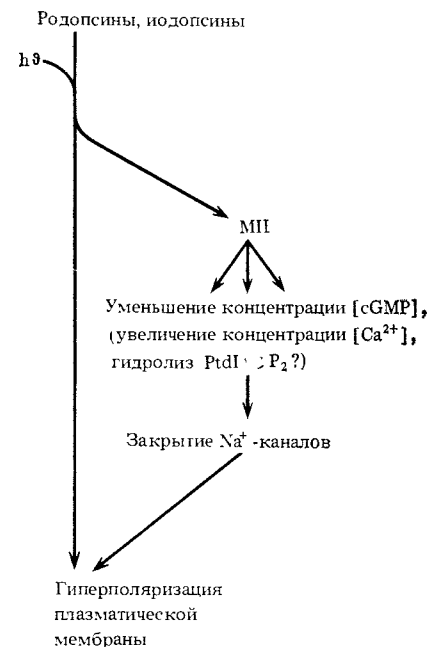
Проблема могла бы быть решена, если допустить, что не трансдуциновый каскад, а какой-то другой механизм лежит в основе восприятия света большой интенсивности. Ниже мы хотели бы представить гипотезу, согласно которой таким механизмом служит генерация родопсином фотоэлектрического потенциала.

Как уже отмечалось выше (см. рис. 68), электрический потенциал, образуемый животным родопсином в ответ на первую световую вспышку, оказывается более 30 мВ, т. е. того же порядка, что ответ бактериородопсина, единственной функцией которого является генерация $\Delta\psi$. Различие двух систем проявляется лишь при ответах на серию вспышек или на постоянный свет. В этих условиях электрогенная активность бактериородопсина сохраняется неизменной, а активность животного родопсина исчезает из-за его перехода в бесцветный опсин. По сути дела, животный родопсин — это фотоэлектрический генератор однократного действия.

Электрический потенциал, генерируемый теми молекулами родопсина, которые локализованы в плазматической мембране фоторецепторной клетки, оказывается того же направления, что генерируемый Na^+/K^+ -АТФазой (знак «минус» в цитоплазме). Это означает, что электрогенная активность родопсина должна повышать $\Delta\psi$ на плазматической мембране. Подобный эффект качественно сходен с таковым при закрытии Na^+ -каналов. Поэтому представляется в принципе возможным, что сильное повышение освещенности может быть воспринято фоторецепторной клеткой без участия каких-либо вторичных медиаторов, просто как резуль-

Рис. 69. Гипотетический механизм возбуждения фоторецепторных клеток позвоночных

Поглощение фотонов родопсином палочек или иодопсинами колбочек вызывает цепь событий, которая приводит к гиперполяризации плазматической мембраны палочек и колбочек. При высоких интенсивностях света гиперполяризация оказывается прямым следствием электрогенной активности родопсина или иодопсинов, локализованных в плазматической мембране и генерирующих на ней фотопотенциал. При низких интенсивностях света действует гораздо более сложная система, использующая преимущественно родопсин дисков. Она включает образование метародопсина II, снижение [cGMP] (а также, может быть, гидролиз дифосфофосфатидилинозита, $(\text{PtdI} \cdot \text{P}_2)$, рост $[\text{Ca}^{2+}]$ и закрытие Na^+ -каналов, повышающее сопротивление плазматической мембраны, что приводит к ее гиперполяризации. На этом пути происходит амплификация сигнала (показана тройной стрелкой)



тат гиперполяризации плазматической мембраны благодаря генерации $\Delta\psi$ родопсином.

Есть основания полагать, что такая гиперполяризация может быть достаточно большой, чтобы вызвать возбуждение фоторецепторной клетки. В одном из наших опытов животный родопсин, сорбированный на коллодиевой пленке, генерировал фотопотенциал до 43 мВ. В силу особенностей методики эта величина должна рассматриваться как нижний предел э.д.с., создаваемой родопсином (см. выше раздел 2.1.2). Можно было бы возразить, что образуемая родопсином $\Delta\psi$ будет шунтирована Na^+ -каналами плазматической мембраны. Однако эта опасность должна быть сведена к минимуму на сильном свете, когда трансдуциновый каскад максимально активирован, уровень cGMP низок, а Na^+ -каналы закрыты.

Еще в 60-е годы было обнаружено [315, 398], что наиболее быстрый светозависимый электрический ответ фоторецепторной клетки имеет двухфазный характер: сначала положительное заряджение внутренней клетки, развивающееся быстрее, чем можно измерить электродами, и затем ее отрицательное заряджение в субмиллисекундной временной шкале, достигающее нескольких милливольт при высокой интенсивности света. Данный ответ, названный ранним рецепторным потенциалом (РРП), рассеивается за несколько миллисекунд.

По нашим данным, РРП — это не более чем выражение фотопотенциальной активности родопсина [492]. При низких интенсивностях света РРП оказывается гораздо меньше позднего рецепторного потенциала обусловленного активацией трансдуцинового каскада. По этой причине физиологи поспешили отнести РРП в разряд бесполезных побочных эффектов. Конечно, РРП не может отвечать за восприятие сигнала, если им служит один фотон. Однако он мог вызвать возбуждение на ярком свете.

Считается, что гиперполяризации порядка 0,4—0,5 мВ достаточно для возбуждения фоторецепторной клетки колбочек [899] и палочек [356] сетчатки глаза. По-видимому, далеко не случайно, что в колбочках, ответственных за цветное зрение на ярком свете, иодопсины (пигменты очень близкие к родопсину [1092]) локализованы только в плазматической мембране, образующей многочисленные выступы. В палочках, которыми мы видим в сумерках, главная масса родопсина находится в фоторецепторных дисках, взвешенных в цитозоле и не связанных с плазматической мембраной.

Иодопсины, подобно родопсину, могут генерировать фотопотенциал, на что указывает способность колбочек образовывать РРП.

Быть может, $\Delta\psi$, генерируемая иодопсинами, обуславливает возбуждение колбочек при высоких интенсивностях света. Это не означает, что колбочки не могут использовать трансдуциновый механизм. Светозависимое снижение (сGMP) было показано не только для палочек, но и для колбочек [394, 699]. Соответственно палочки также могли бы, в принципе говоря, иметь два механизма возбуждения: через трансдуцин, когда основную роль играет количественно преобладающая в палочках фракция родопсина дисков, и через $\Delta\psi$, образуемую теми молекулами родопсина, которые локализованы в плазматической мембране, будучи ответственными за РРП палочек.

Наша концепция механизма зрения вкратце суммирована на рис. 69. Согласно схеме, слабый свет воспринимается главным образом родопсином дисков в палочках через каскад амплификации сигнала, снижающий уровень сGMP и, может быть, также вызывающий гидролиз PIP_2 и возрастание уровня Ca^{2+} в цитозоле. Так или иначе действие каскада завершается закрытием Na^+ -каналов. В результате $\Delta\psi$, образуемая на плазматической мембране палочки за счет работы Na^+, K^+ -АТФазы, перестает сбрасываться потоком Na^+ в клетку и эта мембрана гиперполяризуется. Что касается света большой интенсивности, когда не требуется усиливать световой сигнал, то здесь используется простой и быстрый механизм гиперполяризации, действующий в основном в колбочках: зарядка плазматической мембраны за счет фотопотенциальной активности самого иодопсина (родопсина).

сGMP-путь детально исследован на молекулярном уровне.

Однако, по мнению многих исследователей, он недостаточен для объяснения всех физиологических наблюдений [40, 1625], что указывает на существование альтернативного пути возбуждения фоторецепторной клетки, каковым могла бы быть гиперполяризация посредством родопсина или иодопсина.

Тот факт, что на ярком свете РРП должен быть выше пороговых значений $\Delta\psi$, вызывающих возбуждение колбочек, свидетельствует в пользу реалистичности прямого механизма. Вопрос, по-видимому, лишь в том, как часто прибегает колбочка к его использованию.

«Дуалистическая» схема, предложенная нами для животного родопсина, фактически подобна таковой, доказанной в опытах на *N. halobium*. Как было показано на рис. 66, у бактерии существуют два пути вызвать аттрактантный ответ посредством красного света: один — через бактериородопсин, образующий $\Delta\bar{p}H$ с последующей регистрацией изменения $\Delta\bar{p}H$ протометром, и другой — через сенсорный родопсин, где $\Delta\bar{p}H$ не участвует. Простой расчет показывает, что бактериородопсиновый путь требует эффективного поглощения многих фотонов, чтобы изменить заметным образом $\Delta\psi$ на бактериальной мембране. Еще больше фотонов необходимо для сдвига $\Delta\bar{p}H$, если она находится в форме ΔpH . Напротив, всего нескольких фотонов достаточно для включения системы фототаксиса, использующей сенсорный родопсин (или фобородопсин). Можно полагать, что система сенсорного родопсина аналогична трансдуциновому каскаду и потому применяется для восприятия слабых световых потоков. Как показал в нашей группе С. И. Бибилов, активация сенсорного родопсина галобактерий сопровождается снижением концентрации сGMP, подобно тому, что имеет место в клетках сетчатки [22]. Такая система неизбежно должна быстро насыщаться при повышении интенсивности света [87]. В области мощных световых потоков вступает бактериородопсиновый путь, который включает стадию генерации бактериородопсином $\Delta\psi$ или ΔpH [23].

В животном родопсине, согласно нашей схеме, как бы объединены свойства двух ретинальсодержащих белков, ответственных за восприятие света бактериями. Подобно сенсорному родопсину, животный родопсин может включать каскад амплификации слабого светового сигнала. Подобно бактериородопсину, животный родопсин способен генерировать $\Delta\psi$, которая может использоваться для возбуждения потенциалчувствительной системы фоторецепторной клетки.

В рамках этой концепции оказывается вполне понятным, почему животный родопсин содержит, подобно бактериородопсину, семиколонную мембранную часть, необходимую для генерации $\Delta\psi$, а кроме того, дополнительные гидрофильные последовательности, вынесенные на поверхность мембраны, которые взаимодействуют с трансдуцином и не нужны для генерации $\Delta\psi$.

Большой интерес представляет эволюционный аспект проблемы. Долгое время казалось, что между родопсинами галобактерий и родопсином глаза существует ничем не заполненный пробел. Однако недавно был обнаружен родопсиноподобный пигмент в фоторецепторе одноклеточной водоросли хламидомонады [576]. Показано также, что ретиналь или какие-то другие производные витамина А участвуют в восприятии света в светочувствительных органах не только в сетчатке глаза, но и в некоторых других тканях и клетках. У безглазого клеща была обнаружена такая система, ответственная за фотопериодизм [1552].

Светозависимое сокращение радужной оболочки глаза некоторых позвоночных обусловлено поглощением фотонов в сфинктерных клетках, содержащих родопсиноподобный пигмент в своей плазматической мембране. Фотоизомеризация хромофора в этом пигменте приводит к освобождению ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Освобожденный Ca^{2+} активирует сократительные белки [1279].

Похожая система была описана в светочувствительных нейронах морского моллюска *Aplysia californica* (opisthobranchiate). В цитоплазме этих нейронов были найдены мембранные пузырьки, нагруженные ионами кальция. Пузырьки, названные липохондриями, содержат пигменты с β -каротином и каким-то ретиналь-подобным соединением в качестве хромофоров. Освещение вызывает выход Ca^{2+} из липохондрией. Тот же эффект может быть достигнут в темноте добавкой кальциевого ионофора. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле приводит к росту калиевой проводимости плазматической мембраны нейрона, что ведет к его возбуждению. Сравнение этой системы с фоторецепторами высших животных показало, что она отличается намного большим порогом по свету и гораздо меньшей амплификацией светового сигнала [1883]; см. также обзор: [1412].

3.6. Первичные ДНН-генераторы: заключение

3.6.1. Количество типов ДНН-генераторов в различных видах живых систем

В гл. 3 мы рассмотрели первичные ДНН-генераторы, ответственные за извлечение энергии из внешних ресурсов и ее превращение в конвертируемую форму. В табл. 6 перечислены все известные устройства такого рода и приведена классификация живых систем, использующих первичные ДНН-генераторы.

К типу 1 отнесены системы, получающие энергию посредством светозависимого циклического переноса восстановительных эквивалентов. В состав редокс-цепи входят два ДНН-генератора: бактериальный комплекс реакционных центров и CoQ -цитохром

Таблица 6. Классификация протонной энергетики по типам ДНН-генераторов

Тип	Типичные представители	ДНН-генераторы						
		Светозависимые				Не зависящие от света		
		Бактериальный реакционный центр	Фотосистема I	Фотосистема II	Бактериородопсин	$\text{NADH}-\text{CoQ}$ -редуктаза	CoQH_2 -цитохром c-редуктаза	Цитохром-оксидаза
1	Пурпурные фотосинтезирующие бактерии	+	—	—	—	+	+	?
2	Зеленые бактерии	—	+	—	—	?	?	?
3	Тилакоиды растительных хлоропластов и цианобактерий	—	+	+	—	—	+***	—
4	Митохондрии животных, растений и грибов, <i>Paracoccus denitrificans</i>	—	—	—	—	+	+	+
5	<i>E. coli</i>	—	—	—	—	+*	—	+****
6	Бактерии, восстанавливающие фумарат; митохондрии аскариды	—	—	—	—	+	—	—
7	?	—	—	—	—	—	+	—
8	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosomonas europaea</i>	—	—	—	—	+**	+**	+
9	<i>Halobacterium halobium</i>	—	—	—	+	?	?	?

* Действует с 50%-ной эффективностью.

** Действуют как потребители ДНН, ответственные за обратный перенос восстановительных эквивалентов.

*** PQH_2 -пластоцианин-редуктаза. **** CoQH_2 -оксидаза.

c-редуктаза. Генераторы локализованы в мембране хромофоров и в цитоплазматической мембране бактерий-фотосинтетиков. В тех же мембранах имеется $\text{NADH}-\text{CoQ}$ -редуктаза, которая на свету действует как потребитель ДНН, катализируя обратный перенос электронов к NAD^+ от субстратов с более положительным редокс-потенциалом. В темноте тот же фермент участвует в генерации ДНН, сопряженной с переносом электронов в прямом направлении — от NADH к CoQ и дальше к кислороду. Наиболее изученными примерами данного типа энергетики служат пурпурные бактерии *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* и *Rhodopseudomonas viridis*.

К типу 2 относятся зеленые бактерии, у которых обнаружена простейшая система нециклического светозависимого переноса

электронов. Есть основания предполагать, что механизм генерации $\Delta\bar{p}H$ у этих бактерий напоминает таковой в фотосистеме II хлоропластов. Остается открытой проблема, каким образом зеленые бактерии образуют $\Delta\bar{p}H$ в темноте.

Энергетика типа 3 присуща тилакоидам хлоропластов и цианобактерий. В обоих случаях происходит нециклический перенос восстановительных эквивалентов от H_2O к $NADP^+$. В редокс-цепи идентифицированы три $\Delta\bar{p}H$ -генератора: фотосистема I, фотосистема II и PQH_2 -пластоцианин-редуктаза, гомологичная $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазе.

Типу 4 соответствуют типичные митохондрии животных, растений и грибов. Здесь имеется полный набор $\Delta\bar{p}H$ -генераторов дыхательной цепи, включенной между $NADH$ и O_2 . Подобная цепь, по-видимому, есть и у некоторых дышащих бактерий, например, у *Paracoccus denitrificans*. Однако чаще бактериальные цепи устроены проще, включая либо меньшее число $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, либо упрощенные аналоги митохондриальных $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, характеризующиеся сниженной эффективностью. Так, у *E. coli* (тип 5) дыхательная цепь, окисляющая $NADH$ молекулярным кислородом, характеризуется меньшим соотношением H^+/O , чем цепь митохондрий или *P. denitrificans*. Дело в том, что в дыхательной цепи *E. coli* некоторые $\Delta\bar{p}H$ -генераторы либо вовсе отсутствуют, либо, появляясь при определенных условиях роста бактерий, переносят через мембрану меньше протонов на каждый перенесенный электрон, чем их митохондриальные аналоги. Неясно, является ли сниженная энергетическая эффективность дыхания *E. coli* первичным или вторичным событием: эта бактерия еще не «изобрела» эффективных $\Delta\bar{p}H$ -генераторов или утратила их в результате мутаций, приспособления к неблагоприятным условиям среды и т. д.

Сокращение редокс-цепи неизбежно при жизни в природных анаэробных нишах, поскольку конечный этап дыхания — потребление кислорода — здесь невозможен. Примером сокращенных цепей, включающих только один (первый) $\Delta\bar{p}H$ -генератор, могут быть анаэробные бактерии, восстанавливающие фумарат, и митохондрии имаго аскариды (тип 6).

Энергетика типа 8 присуща *Thiobacillus ferrooxidans* и некоторым другим бактериям, окисляющим субстраты с положительным редокс-потенциалом. Чтобы образовать $\Delta\bar{p}H$, здесь используется только цитохромоксидазный генератор, так как субстрат не может восстановить начальные и средние сегменты дыхательной цепи; $\Delta\bar{p}H$ -генераторы, локализованные в этих сегментах, действуют как потребители $\Delta\bar{p}H$, производя обратный перенос восстановительных эквивалентов от донора электронов, скажем, Fe^{2+} , к $NAD(P)^+$.

Особый случай — энергетика *Halobacterium halobium*, где обнаружен бактериородопсин, светозависимый протонный насос (тип. 9). В темноте $\Delta\bar{p}$ образуется у этих бактерий дыхательной

цепью. Количество $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в цепи *H. halobium* остается неизвестным.

Под номером 7 в табл. 6 фигурирует еще одна энергетическая система, использующая CoQ -цитохром *c*-редуктазу в качестве единственного механизма генерации $\Delta\bar{p}H$. Предполагается, что гипотетический организм (бактерия?), относящаяся к типу 7, окисляет субстрат с редокс-потенциалом около нуля (например, сукцинат) каким-либо акцептором электронов с редокс-потенциалом около 0,3 В. Другой возможный кандидат на роль представителя энергетической системы типа 7 — это аэроб, использующий только средний участок цепи для генерации $\Delta\bar{p}H$, в то время как начальные и конечные сегменты представлены ферментами свободного (несопряженного) переноса электронов.

3.6.2. Соотношение процессов переноса протонов и электронов в механизмах, генерирующих $\Delta\bar{p}H$

Как должно быть ясно из сказанного в этой главе, генерация $\Delta\bar{p}H$ является следствием переноса протонов или электронов через гидрофобный барьер мембраны. В большинстве исследованных на этот предмет $\Delta\bar{p}H$ -генераторов трансмембранное разделение зарядов организовано таким образом, что часть расстояния покрывается электроном, а часть — протоном, движущимся в противоположную сторону.

Явным исключением из этого правила служит бактериородопсин, где протон пересекает всю толщину мембраны.

Таблица 7. Вероятные вклады процессов переноса электронов и протонов в трансмембранное разделение зарядов различными $\Delta\bar{p}H$ -генераторами

$\Delta\bar{p}H$ -генератор	Вероятная доля общей $\Delta\bar{p}H$, образуемой при переносе	
	электрона	протона
Бактериородопсин	0	1,0
Бактериальные реакционные центры	0,95	0,05
Фотосистема I хлоропластов	0,95 *	0,05 *
Фотосистема II хлоропластов	0,95 *	0,05 *
$CoQH_2$ -цитохром <i>c</i> -редуктаза	0,3—0,5	0,5—0,7
Цитохромоксидаза	0,3—0,5	0,5—0,7
$NADH-CoQ$ -редуктаза	0,3—0,5 **	0,5—0,7 **

* По аналогии с бактериальными реакционными центрами.

** По аналогии с двумя другими $\Delta\bar{p}H$ -генераторами дыхательной цепи.

В бактериальных реакционных центрах перенос электрона обеспечивает запасание порядка 95% аккумулируемой энергии, а перенос протона — всего 5%. Есть ряд косвенных свидетельств того, что подобная ситуация характерна также для фотосистем I и II хлоропластов и цианобактерий.

В CoQH_2 -цитохром *c*-редуктазе приблизительно 40% пути проходит, по всей вероятности, электрон, перемещающийся с гема b_l на гем b_h . Если это так, то на долю протона остается около 60% толщины мембраны. Подобные соотношения, по-видимому, характерны и для цитохромоксидазного генератора.

Наиболее неопределенной остается проблема механизма генерации $\Delta\bar{p}H$ NADH-CoQ -редуктазой. Кажется вероятным, что по крайней мере часть пути здесь проходит протон. В противном случае пришлось бы постулировать, что часть переносчиков электронов этого звена дыхательной цепи находится на внутренней, а часть — на внешней стороне мембраны митохондрий. В действительности на наружной поверхности таких центров выявить не удается.

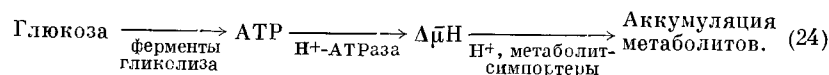
Рассмотренные соотношения суммированы в табл. 7.

H^+ —АТРазы — вторичные $\Delta\bar{p}H$ -генераторы

4.1. Определение и классификация

Все $\Delta\bar{p}H$ -генераторы, описанные в предыдущей главе, используют энергию света или дыхания, чтобы образовать протонный потенциал. АТР не участвует в этом процессе. В настоящей главе мы рассмотрим другой случай, когда путь от использования энергетических ресурсов к $\Delta\bar{p}H$ оказывается более сложным: энергия сначала превращается в АТР и лишь затем используется для генерации $\Delta\bar{p}H$ посредством H^+ —АТРаза. Последние могут быть объединены термином «вторичные $\Delta\bar{p}H$ -генераторы».

Как правило, H^+ —АТРазы оказываются необходимыми, если ни свет, ни энергия дыхания недоступны для мембраны, совершающей какую-то работу, связанную с расходом $\Delta\bar{p}H$. Примером такой системы могут быть анаэробные бактерии, получающие энергию гликолитическим путем. У таких бактерий АТР, образованный ферментами гликолиза, может утилизироваться H^+ —АТРазой, находящейся в цитоплазматической мембране. $\Delta\bar{p}H$, генерируемая H^+ —АТРазой, используется для совершения осмотической работы — аккумуляции метаболитов при участии H^+ , метаболит-симпортеров:



Формально любой фермент, способный генерировать $\Delta\bar{p}H$ за счет энергии АТР, может рассматриваться как H^+ —АТРаза. H^+ —АТР-синтаза, обычно используемая для образования АТР за счет энергии $\Delta\bar{p}H$, обладает H^+ —АТРазной активностью, т. е. может гидролизовать АТР и создавать $\Delta\bar{p}H$. По этой причине данный фермент часто называют H^+ —АТРазой. Однако, по нашему мнению, более уместно употреблять название H^+ —АТРаза только в тех случаях, когда основной биологической функцией фермента служит гидролиз, а не синтез АТР.

Введя такое ограничение, мы можем отнести к H^+ —АТРазам несколько ферментов, отличающихся по структуре и механизму действия, но имеющих общую функцию.

Описаны H^+ —АТРазы, состоящие из нескольких белковых субъединиц с массами не более 65 кДа. Комплекс может быть легко разделен на два субкомплекса: протонпроводящий фактор F_0 и каталитический фактор F_1 . Гидролиз АТР ферментами этого типа происходит без образования фосфорилированных интермедиатов. К этому типу АТРаза, определяемых, как F_0F_1 —АТРаза, относится

H^+ —АТРаза некоторых строго анаэробных бактерий. Следует отметить, что все перечисленные свойства присущи также H^+ —АТР-синтазе митохондрий, хлоропластов, хромофоров и цитоплазматических мембран дышащих или фотосинтезирующих бактерий (см. ниже раздел 5.1.1).

Другие H^+ —АТРазы представляют собой очень длинный полипептид (порядка 100 кДа), которому может сопутствовать меньшая субъединица, несущая скорее регуляторные, чем каталитические функции. Реакция начинается с фосфорилирования одного из остатков аспартата большой субъединицы, что вызывает ее конформационный переход, обозначаемый $E_1 \rightarrow E_2$. Этот переход, по-видимому, сопровождается снижением свободной энергии гидролиза фосфориласпартата. Последующее дефосфорилирование фермента регенерирует исходную форму E_1 . Описанный механизм

Таблица 8. Вторичные ΔpH -генераторы

Фермент	Локализация	Механизм	Функции, поддерживаемые сформированной ΔpH
H^+ —АТРаза	Цитоплазматическая мембрана облигатных анаэробных бактерий	F_0F_1	Накопление веществ и регуляция pH в клетке
H^+ —АТРаза	Внешняя мембрана растений и грибов	E_1E_2	Накопление веществ и регуляция pH в клетке
H^+ —АТРаза	Тонoplast растений и грибов	Отличный от F_0F_1 и E_1E_2	Накопление веществ в вакуоли, регуляция pH
H^+ —АТРаза	Внешняя мембрана клеток некоторых животных	?	Секреция H^+ . Накопление веществ в клетке?
H^+ —АТРаза	Мембраны секреторных пузырьков, эндосом, лизосом, аппарата Гольджи. Мембрана эндоплазматического ретикулума	?	Накопление веществ и регуляция pH в пузырьках
H^+ —АТР-синтаза (обращенная)	Цитоплазматическая мембрана дышащих или фотосинтезирующих бактерий	F_0F_1	Накопление веществ и регуляция pH в клетке, вращение флагелл в отсутствие O_2 и света
H^+ —АТР-синтаза (обращенная)	Внутренняя мембрана митохондрий	F_0F_1	Транспорт веществ в митохондрии в отсутствие O_2
H^+/K^+ —АТРаза	Внешняя мембрана клеток эпителия желудка	E_1E_2	Секреция H^+

подобен таковому Na^+/K^+ —АТРаза и Ca^{2+} —АТРаза (см. ниже разделы 7.1.3.2 и 7.7). E_1E_2 —АТРазы описаны во внешних клеточных мембранах растений и грибов. Такая же структура была обнаружена у H^+/K^+ —АТРаза эпителия желудка.

Недавно выяснилось, что существует еще один тип H^+ —АТРаз, отличный как от F_0F_1 , так и от E_1E_2 . Его примером может быть H^+ —АТРаза тонопласта — мембраны, ограничивающей вакуоли клеток растений и грибов. Быть может, к тому же типу H^+ —АТРаз следует отнести ферменты, обнаруженные в мембранах секреторных пузырьков, эндосом и лизосом, а также аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и во внешней клеточной мембране некоторых животных тканей. Однако в последнем случае более типично присутствие Na^+/K^+ —АТРаза.

Кроме роли H^+ —АТРаз в совершении осмотической работы, следует отметить еще одну их функцию, а именно регуляцию внутриклеточного pH.

В мембранах, содержащих H^+ —АТР-синтазу, генерация ΔpH за счет гидролиза АТР может быть следствием обращения реакции, катализируемой этим ферментом. Такой эффект имеет место, например, у некоторых бактерий, использующих как энергию дыхания или света, так и энергию гликолиза. Если такие бактерии подвижны, то ΔpH , образованная за счет гликолитического АТР, может использоваться наряду с транспортом метаболитов и pH-регуляцией для совершения механической работы, т. е. вращения жгутика.

Список вторичных ΔpH -генераторов приведен в табл. 8.

В этой главе мы рассмотрим H^+ —АТРазы. Что касается АТРазной активности H^+ —АТР-синтаз, то она будет разобрана в следующей главе (разд. 5.1.1).

4.2. H^+ —АТРазы облигатно анаэробных бактерий

H^+ —АТРаза бактерий — облигатных анаэробов представляет собой какой-то вариант ферментов F_0F_1 -типа, действующих в качестве АТР-синтазы в митохондриях, хлоропластах, дышащих и фотосинтезирующих бактериях.

Наиболее изученным объектом такого рода является *Lactobacillus casei*, исследованная в нашей группе Г. В. Тихоновой, Е. И. Милейковской и др. В опытах на целых клетках было найдено, что гликолизирующая *L. casei* генерирует мембранный потенциал, который сбрасывается протонофорами или ДЦКД, гидрофобным реагентом на протонированные карбоксильные группы. Мембранный потенциал, искусственно созданный за счет выхода из бактерий ионов K^+ в присутствии валиномицина, в течение некоторого времени поддерживает синтез АТР. Этот синтез также чувствителен к протонофорам и ДЦКД [258].

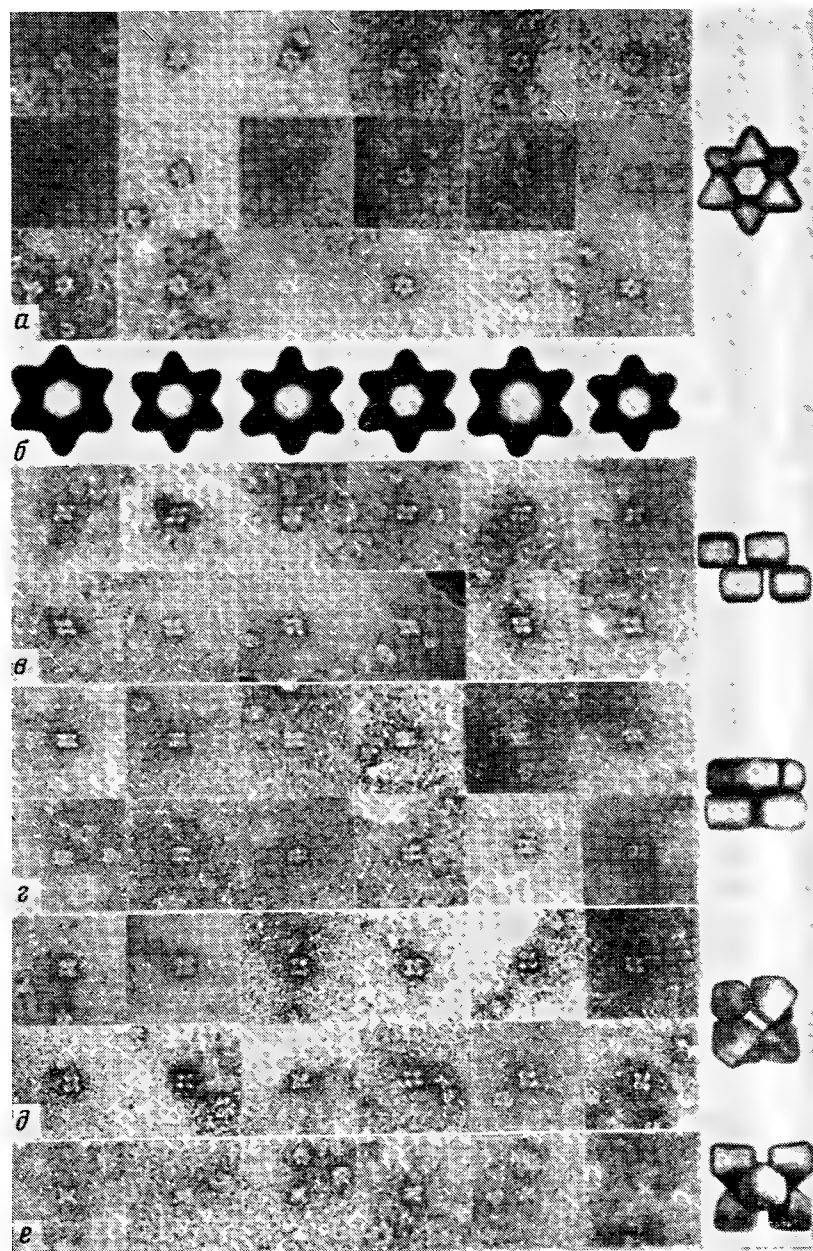


Рис. 70. Электронно-микроскопическое изображение каталитической F_1 части H^+ —АТРаза *Lactobacillus casei*

Увеличение 27 000 раз (а, в — е) или 1 530 000 раз (б). Справа показаны различные проекции модели. а, в — е — исходные микрофотографии; б — наложение изображений молекулы H^+ —АТРаза при вращении на 60° (по: Бикетов и соавт. [258])

На вывернутых субклеточных частицах *L. casei* было найдено, что гидролиз АТР тормозится ДЦКД.

Три различных метода, примененных ранее в опытах с митохондриями для диссоциации водорастворимой каталитической части (F_1) от комплекса F_0F_1 , привели во всех случаях к выделению белка с АТРазной активностью, устойчивой к действию низких концентраций ДЦКД, эффективных на субклеточных частицах.

Электронно-микроскопический анализ очищенного фактора F_1 из *L. casei* показал [258], что шесть субъединиц образуют правильную двуслойную структуру с тремя субъединицами в каждом слое (рис. 70). Похожая структура была обнаружена при изучении митохондриального фактора F_1 (см. ниже раздел 5.1.4.2).

Из мембран *L. casei*, лишенных фактора F_1 , был изолирован фактор F_0 и встроен в протеолипосомы. После реконструкции с очищенным фактором F_1 протеолипосомы демонстрировали взаимопревращение АТР — ΔpH , чувствительное к ДЦКД и разобщителям [1031].

По молекулярной массе, субъединичному составу, трехмерной структуре и чувствительности к ингибиторам АТРаза *L. casei* явно отличается от АТРаза E_1E_2 -типа. В частности, было показано, что ванадат и гидроксилламин, тормозящие все известные E_1E_2 —АТРаза на стадии фосфорилированного фермента, никак не влияют на АТРаза из *L. casei* [140, 258].

Указание на то, что H^+ —АТРаза строгих анаэробов напоминает F_0F_1 , но имеет более простой набор субъединиц, было получено Кларком и соавт. [387], изучавшими *Clostridium pasteurianum*.

Проведенное Харольдом и соавт. исследование H^+ —АТРаза факультативного анаэроба *Streptococcus faecalis* [683, 686] выявило субъединичный состав фактора F_1 , обычный для дышащих и фотосинтезирующих бактерий. Возможно, что *S. faecalis* представляет собой пример вторичного анаэроба, т. е. бактерии, первоначально жившей в аэробных условиях и затем перешедшей в бескислородную нишу (см. также [1005]).

4.3. H^+ —АТРаза внешней клеточной мембраны растений и грибов

Во внешней клеточной мембране растений и грибов (плазмалемме) имеется фермент, откачивающий ионы H^+ из клетки за счет энергии АТР. Транспорт H^+ носит электрогенный характер. H^+ —АТРаза, о которой идет речь, относится к E_1E_2 -типу. В процессе реакции возникает аспартилфосфатный интермедиат, чувствительный к ванадату и гидроксилламину. Ингибиторами служат также диэтилстильбэстрол и ДЦКД.

Очистка H^+ —АТРаза показала, что это одиночный полипептид с массой несколько больше 100 кДа. Его содержание во внешней мембране достигает 15% от общего количества белка (см. обзоры: [108, 109, 620, 621, 992, 1352]). Первичная структура и упаковка в мембране остаются неизвестными.

Принято считать, что H^+ —АТРаза из внешних мембран растений и грибов близки по своим свойствам, вплоть до общности антигенных детерминант. Однако есть указания и на определенные отличия. Так, N-этилмалеимид тормозит H^+ —АТРазау плазмалеммы дрожжей, но не растительных клеток [1374].

Механизм реакции H^+ —АТРаза внешней мембраны, по-видимому, аналогичен таковому других E_1E_2 —АТРаз (см. ниже раздел 7.1.3.2). Однако этот аспект еще ждет своего детального анализа.

H^+ —АТРаза из мембран грибов [1556] и растений [1352] были реконструированы в протеолипосомы. В этой системе была показана обратимость гидролиза АТР, когда $\Delta\psi$, искусственно созданная диффузией K^+ , использовалась для синтеза АТР [992].

Уорнке и Слэймэн [1575], применив микроэлектроды, прямо измерили вольт-амперные характеристики H^+ —АТРаза плазмалеммы клеток *Neurospora crassa*. Полученные данные сопоставили с результатами измерения ΔpH и свободной энергией гидролиза АТР, чтобы рассчитать отношение $H^+/АТР$. Оно оказалось близко к единице, повышаясь до двух в условиях протонного контроля. В той же лаборатории измерение отношения $H^+/АТР$ другим методом (на мембранных пузырьках из плазмалеммы *N. crassa*) дало величину 1. Подобный подход, примененный к мембранным пузырькам из *E. coli*, выявил отношение $H^+/АТР$, равное двум [1183].

Такешиге и соавт. [1485] показали посредством микроэлектродных измерений, что H^+ —АТРаза ответственна почти за весь ток, генерируемый через плазмалемму клетки водоросли *Nitellopsis obtusa* (20 $mA \cdot m^{-2}$ при $\Delta\psi = -220$ мВ). В этом опыте тонопласт был удален перфузией. В перфузат добавляли АТР, чтобы снабдить АТРазау ее субстратом.

По-видимому, определенный биологический смысл имеет то обстоятельство, что H^+ —АТРаза внешней мембраны характеризуется оптимумом pH между 6 и 7. При pH выше 7 активность фермента резко падает. Создается впечатление, что H^+ —АТРаза, откачивая ионы H^+ из цитоплазмы, используется клеткой, чтобы предотвратить закисление внутриклеточного объема. Возможно, регуляция внутреннего pH есть одна из функций H^+ —АТРаза плазмалеммы. В то же время очевидна и другая функция этого фермента: образуемая им ΔpH используется для концентрирования в клетке различных веществ, которые транспортируются туда вместе с протонами (см. ниже раздел 5.2).

В нескольких лабораториях были получены указания, что в мембране оболочки хлоропласта также есть АТРаза, подобная ферменту из плазмалеммы растений тем, что она чувствительна к ванадату [481, 789, 1103, 1104, 1006, 1489]. Существует, однако, и противоположное мнение, что мембрана оболочки хлоропласта энергизуется фотосинтетической редокс-цепью, а не H^+ —АТРазой [1261]. Для доказательства существования данной H^+ —АТРаза необходима прямая демонстрация образования ею ΔpH . H^+ —АТРаза, ингибируемая ванадатов, обнаружена в мембране, окружающей бактериод (Rhizobium) в корнях сои [271].

Ванадат- и диэтилстильбэстролю чувствительная H^+ —АТРаза описана во внешней мембране амебной формы *Dictiostellum discoideum*. Фермент был реконструирован в протеолипосомы [1195].

4.4. H^+ —АТРаза тонопласта

Тонопласт — мембрана, ограничивающая вакуоли в клетках растений и грибов.

Хорошо известно, что между вакуолью и цитозолем существуют градиенты pH, ионов и метаболитов. Недавно в тонопласте была идентифицирована особая H^+ —АТРаза, создающая ΔpH как движущую силу транспорта веществ в сторону большей их концентрации. Центр связывания АТР этой АТРазой обращен в цитозоль.

Показано, что изолированные вакуоли способны к электрогенному поглощению ионов H^+ , сопряженному с гидролизом АТР. Транспорт H^+ и АТРазная активность подавляются уникальным набором ингибиторов, включающим нитрат, N-этилмалеимид, триалкилдолово и высокие концентрации ДЦКД. Ингибиторы митохондриальной H^+ —АТР-синтазы: олигомицин и ДЦКД в низких концентрациях — не влияют на H^+ —АТРазау тонопласта. Она не тормозится диэтилстильбэстролом, блокирующим H^+ —АТР-синтазу митохондрий и H^+ —АТРазау внешней клеточной мембраны растений и грибов; не влияет на нее и ванадат. Ферменты животных митохондрий, хлоропластов и плазмалеммы, способные расщеплять АТР, в отличие от АТРаза тонопласта не тормозятся нитратом [290, 443, 986, 987, 992, 1352]. В то же время H^+ —АТР-синтаза растительных митохондрий чувствительна к нитрату [1574]. H^+ —АТРаза тонопластов была выделена и встроена в протеолипосомы [937].

По специфичности в отношении субстрата и двухвалентного катиона-активатора H^+ —АТРаза тонопласта отличается от таковой плазмалеммы и аналогична H^+ —АТР-синтазе митохондрий (табл. 9) (см. обзоры: [992, 1352]). Дополнительная общая черта тонопластной и митохондриальных систем была выявлена Боу-

Таблица 9. Сравнение митохондриальной H^+ —АТР-синтазы с H^+ —АТРазами из тонопласта и плазматических мембран бактерий-анаэробов, растений и грибов

Свойство	H^+ —АТРазаы			H^+ —АТР-синтаза митохондрий
	Плазмалемма растений и грибов	Тонопласт	Плазматическая мембрана <i>L. casei</i>	
Молекулярная масса субъединиц, кДа	100	(72—100) _n ; (62—68) _n ; 16—24; 12—14; 12?; 9?	(57) ₃ ; (55) ₃ ; 40; 22; 14	(53) ₃ ; (51) ₃ ; 30; 15; 5,5
Металл-активатор	Mg^{2+}	Mg^{2+} или Ca^{2+}	Mg^{2+} или Ca^{2+}	Mg^{2+} или Ca^{2+}
Оптimum pH	6—7	7—8	6—8	8—9
Чувствительность к ингибиторам				
ДЦКД (низкой концентрации)	—	—	+	+
ДЦКД (высокой концентрации)	+	+	+	+
Олигомицин	—	—	—	+
Азид	—	—	+	+
Нитрат	—	+	—	— (+ в растениях)
Ванадат	+	—	—	—
Диэтилстильбэстрол	+	—	Не изучен	+

мэном [290], идентифицировавшим в H^+ —АТРазае тонопласта сравнительно небольшую белковую субъединицу, ковалентно связывающую ДЦКД.

Однако по некоторым свойствам тонопластная H^+ —АТРаза отличается от митохондриальной. Так, она имеет другой оптимум pH. Описаны мутанты по митохондриальной H^+ —АТР-синтазе, в которых тонопластная H^+ —АТРаза остается неизменной [290].

В 1985 г. три группы [84, 938, 988, 1532] опубликовали данные по субъединичной структуре H^+ —АТРазаы тонопластов. Субъединицы имели следующие относительные массы при электрофорезе с додецилсульфатом, кДа: 89, 64 и 19,5 [1532]; 110, 68, 24 и 12 [988] и 72, 62, 16, 14, 12 и 9 [84, 938] (см. также [1241]). Две крупные субъединицы присутствовали в нескольких экземплярах. Наиболее легкая субъединица связывала ДЦКД и N-этилмалемид.

4.5. Немитохондриальные H^+ —АТРазаы животных клеток

4.5.1. H^+ —АТРаза хромаффинных гранул

Первым достаточно подробно охарактеризованным ферментом этого класса оказалась H^+ —АТРаза из внутриклеточных пузырьков, накапливающих катехоламины в клетках мозгового слоя надпочечников. Пузырьки, названные хромаффинными гранулами, содержат огромные количества адреналина и норадреналина, концентрация которых в гранулах (0,55 М) превосходит таковую в цитозоле в 25 000 раз [1113]. Катехоламины — основные по количеству катионы хромаффинных гранул. Протоионом для них является АТР, концентрация которого внутри пузырьков превышает 0,1 М. Есть указания на то, что катехоламины и АТР служат симпатическими котрансмиттерами, взаимодействующими с различными рецепторами [549]. Аккумуляция катехоламинов внутри хромаффинных гранул опосредована антипортером, обменивающим два иона H^+ изнутри гранул на один катион катехоламина снаружи. Движущей силой процесса оказывается $\Delta\bar{H}$, генерируемая H^+ —АТРазой, которая переносит H^+ снаружи внутрь пузырьков [172, 1113].

Главная проблема в изучении АТРазаы хромаффинных гранул состоит в том, чтобы отделить ее от митохондриальной H^+ —АТР-синтазы, присутствующей в той же клетке в гораздо больших количествах.

В литературе имеется ряд противоречивых данных относительно молекулярных свойств АТРазаы хромаффинных гранул. Некоторые авторы настаивают на том, что это фермент, похожий на митохондриальную H^+ —АТР-синтазу, но не идентичный ей [173, 1113, 1114, 1325, 1475, 1604].

В то же время Цидон и Нельсон [381, 382] недавно сообщили о выделении и стократной очистке совершенно другого фермента из мембран хромаффинных гранул. Эта АТРаза состоит из субъединиц следующих четырех основных типов: 115, 72, 57 и 39 кДа (см. также [1181]). Тяжелая субъединица несет, по-видимому, каталитический центр фермента, одна молекула которого содержит не менее четырех таких субъединиц. Иммунодекорирование препарата АТРазаы не дало никаких указаний на наличие примесей H^+ —АТР-синтазы митохондрий. Исследование на уровне протеолипосом показало, что H^+ —АТРаза катализирует электрогенный транспорт H^+ [380]. Полученная АТРаза была нечувствительная к олигомицину и требовала для торможения в 50 раз большие количества ДЦКД, чем H^+ —АТР-синтаза. Объектом атаки ДЦКД оказалась тяжелая субъединица. Отделение от мем-

браны десенсibiliзировало АТРа́зу в отношении ДЦКД [380]. Ванадат, блокирующий E_1E_2 —АТРа́зы, не влиял на H^+ —АТРа́зу хромаффинных гранул [171, 450]. В то же время она была чрезвычайно чувствительна к реагенту на SH-группы N-этилмалеими́ду (полумаксимальное торможение при 13 мкМ) [566].

4.5.2. Другие H^+ —АТРа́зы

Теперь уже совершенно ясно, что H^+ —АТРа́за хромаффинных гранул — лишь первый пример в довольно длинном ряду немитохондриальных H^+ —АТРаз животных клеток. Их перечень дан в табл. 10, из которой видно, что различные типы животных клеток используют H^+ —АТРа́зы, чтобы образовать ДЦН и накапливать в особых пузырьках гормоны или нейротрансмиттеры перед их экскрецией из клетки-продуцента. Такой механизм продемонстрирован, кроме катехоламинов, для серотонина в тромбоцитах, ацетилхолина в синаптических пузырьках, группы гормонов в гипофизе и инсулина в поджелудочной железе.

Кроме того, H^+ —АТРа́за описана в лизосомах, эндосомах, окаймленных пузырьках и внешней мембране клеток некоторых животных тканей, таких, как почки и мочевой пузырь. В литературе можно найти указания на функционирование H^+ —АТРа́зы в плазматической мембране клеток мозга и асцитных клетках Эрлиха, а также в мембранах аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (см.: табл. 10 и [975]). В некоторых случаях эти H^+ —АТРа́зы реконструировали с фосфолипидами, чтобы получить протеолипосомы (см., например, [1631, 1633]).

В доступной литературе можно найти всего несколько публикаций о структурных характеристиках ферментов данного типа.

При изучении синаптических пузырьков из электрического органа *Torpedo marmorata* Харлос и соавт. [681] получили фермент с массой порядка 250 кДа, состоящий из 50 кДа-субъединиц. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы идентифицировать этот белок с H^+ —АТРа́зой синаптических пузырьков. В то же время H^+ —АТРа́за из окаймленных пузырьков (масса 530 кДа), очищенная в 200 раз, содержала совсем иной набор субъединиц: 116 кДа, 70, 58, 40, 38, 34, 33 и 15 кДа [1631].

Все АТРа́зы, перечисленные в табл. 10, обладают некоторыми свойствами, напоминающими H^+ —АТРа́зу тонопласта. Они устойчивы к олигомицину, ванадату и диэтилстильбэстро́лу: чувствительны к ДЦКД, но, как правило, в больших концентрациях, чем H^+ —АТР-синтаза митохондрий; чувствительны к N-этилмалеими́ду. Однако действующие концентрации N-этилмалеими́да в случае животных H^+ —АТРаз оказываются гораздо меньшими, чем для фермента тонопласта. Кроме того, тонопластная H^+ —АТРа́за полностью тормозится нитратом, в то время как животные H^+ —АТРа́зы устойчивы к действию этого аниона [1544].

Таблица 10. Немитохондриальные H^+ —АТРа́зы животных клеток

№ п/п	Органелла или мембрана	Источник	Функция	Литературный источник
1.	Хромаффинная гранула	Мозговой слой надпочечника	Образование ДЦН для обеспечения транспорта веществ	[171, 380, 381, 549, 650, 1113, 1114, 1604]
2.	Пузырьки, накапливающие серотонин	Тромбоцит	То же	[450, 564, 1599]
3.	Синаптический пузырек	Мозг; сердце; электрический орган <i>Torpedo</i>	»	[162, 166, 681, 1445, 1516, 1529, 1610]
4.	Пузырьки, накапливающие гормон	Гипофиз	»	[348, 951a, 1282a, b, 1314]
5.	То же	Паротиды	»	[1121]
6.	»	Поджелудочная железа	»	[752, 753]
7.	Лизосома	Печень, лимфо-бласты	Защелечение среды внутри пузырька	[457, 680, 785, 1075, 1245, 1326]
8.	Эндосомы, окаймленные пузырьки	Фибробласты, мозг, печень	»	[567, 1288, 1459, 1543, 1544, 1631—1633, 1636]
9.	Внешняя мембрана клетки	Эпителий мочевого пузыря	Защелачивание цитоплазмы	[617, 618, 961, 1641]
10.	То же	Почка	То же	[573, 821, 851, 1295, 1632]
11.	»	Мозг, клетки асцита	»	[1632]
12.	Аппарат Гольджи	Печень	?	[221, 1644]
13.	Эндоплазматический ретикулум	Печень	?	[237, 1263]

Примечание. Для № 11—13 данные имеют предварительный характер.

Необходимы структурные исследования, чтобы ответить на вопрос, являются ли животные H^+ —АТРа́зы родственными таковой тонопласта (см. также [975]).

4.5.3. H^+/K^+ —АТРа́за слизистой желудка

Уникальная АТРа́за, образующая ДЦН, была обнаружена Гансером и Форте [593] во внешней мембране клеток слизистой желудка. Фермент осуществляет электронейтральный обмен внутриклеточного H^+ на внешний K^+ , тем самым закисляя среду в желудке. Он был назван H^+/K^+ —АТРа́зой.

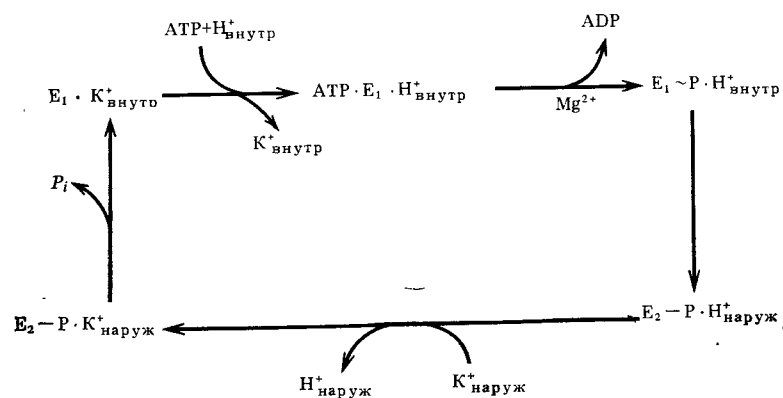


Рис. 71. Гипотетический механизм действия H^+/K^+ —АТРаза из внешней мембраны клеток слизистой желудка (по: Сакс и соавт. [1286])

H^+/K^+ —АТРаза была очищена и механизм ее исследован в основном в группе Сакса (см. обзор: [1286]). Недавно Сакс и его коллеги реконструировали фермент в протеолипосомы [1220].

Было установлено, что H^+/K^+ —АТРаза принадлежит к E_1E_2 -типу, подобно H^+ —АТРаза плазмалеммы растений и грибов, Na^+/K^+ —АТРаза и Ca^{2+} —АТРаза. Так, фермент содержит полипептид массой около 100 кДа, реакция протекает с образованием фосфорилированного интермедиата, активность тормозится ванадатом и гидроксиламинном. В то же время структуре H^+/K^+ —АТРаза присуща специфическая особенность. Этот фермент, по-видимому, построен из трех подобных, но не идентичных субъединиц с молекулярными массами порядка 100 кДа.

На основе целого ряда наблюдений был постулирован следующий механизм работы H^+/K^+ —АТРаза, по существу аналогичный таковому Na^+/K^+ — и Ca^{2+} —АТРаза. Согласно схеме (рис. 71), комплекс K^+ и фермента в E_1 -конформации связывает АТР и ион H^+ на цитоплазматической поверхности плазмалеммы, окружающей клетку слизистой эпителия желудка. При этом ион K^+ освобождается в цитоплазму. В тройном комплексе $E_1 \cdot ATR \cdot H^+$ происходит обратимый Mg^{2+} -зависимый перенос фосфора с АТР на одну из карбоксильных (аспаратных?) групп фермента. В результате образуется интермедиат $E_1 \sim P \cdot H^+$. Затем происходит конформационный переход ($E_1 \rightarrow E_2$), сопровождающийся переброской иона H^+ через гидрофобный барьер мембраны. Полученный комплекс $E_2 \sim P \cdot H^+$ уже не способен фосфорилировать АТР. Замена H^+ , связанного с $E_2 \sim P$, на внеклеточный K^+ приводит к выделению H^+ , который оказывается в конечном счете в просвете желудка. Кроме того, связывание иона K^+

вызывает гидролиз $E_2 \sim P$. Следующий за этим переход $E_2 \rightarrow E_1$ завершает цикл [1286].

Недавно аналогичный фермент был описан в эпителии толстой кишки.

4.6. Соотношение функций H^+ —АТРаза

Как уже отмечалось в разделе 4.1, H^+ —АТРаза обычно выполняют две основные функции: энергизацию мембраны и создание нужного рН в одном из двух отсеков, разделенных мембраной.

У анаэробных бактерий, живущих гликолизом, АТР гидролизуется H^+ —АТРазой, чтобы образовать ΔpH и затем использовать ее при аккумуляции веществ среды внутрь клетки.

В то же время нельзя сбрасывать со счетов роль H^+ —АТРаза, откачивающей ионы H^+ из клетки, в борьбе с закислением цитоплазмы, тенденция к которому всегда имеется в бактериях-анаэробах, сбраживающих нейтральные сахара до кислых конечных продуктов. Последняя функция присуща также и H^+ —АТРаза плазмалеммы растений и грибов, которая активизируется при падении цитоплазматического рН ниже 7,0. По-видимому, при кислых рН не генерация ΔpH для совершения осмотической работы, а откачка протонов как таковая становится ведущей функцией этой H^+ —АТРаза.

В некоторых животных тканях та же проблема решается по крайней мере частично, особыми веществами, специализированными на роли рН-буферов. Таковы карнозин и ансерин, имеющие рК около 7,0. Эти дипептиды присутствуют в больших количествах в скелетных мышцах, переходящих на гликолиз при тяжелой и длительной работе (подробнее см. ниже раздел 6.3.3). В некоторых других животных тканях роль стабилизатора внутриклеточного рН может, по-видимому, брать на себя плазмалеммальная H^+ —АТРаза, подобно тому как это происходит у растений и грибов. Ракер и соавт. [1632] предположили даже, что H^+ —АТРаза — универсальный компонент внешней мембраны животных клеток. Авторы указывают на ее присутствие в плазмалемме клеток мозга и асцитного рака. В этих случаях внешняя клеточная мембрана энергизуется Na^+/K^+ —АТРазой, а осмотическая работа совершается за счет ΔpNa (см. ниже раздел 7.2.1.1). В то же время H^+ —АТРаза могла бы использоваться как механизм, предотвращающий падение цитоплазматического рН, которое особенно вероятно в активно гликолизирующих опухолевых клетках.

Функцией другой группы животных H^+ —АТРаза является закисление среды внутри пузырька. Именно так обстоит дело в лизосомах, эндосомах и, может быть, в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме. В этих случаях $\Delta \Psi$, генерируемая H^+ —АТРазой, превращается в ΔpH посредством электрофоретической аккумуляции какого-либо аниона, например Cl^- . В ли-

зосомах закисление внутренней среды создает оптимальный рН для работы литических ферментов. По сути дела, лизосомальные ферменты неактивны при нейтральном рН, типичных для цитозоля. В результате компоненты цитозоля не могут быть переварены каким-либо лизосомальным ферментом, даже если он выйдет из лизосомы. По-видимому, кислый рН необходим также для работы эндосом и некоторых других цитоплазматических включений, располагающих H^+ —АТРа́зами.

Иную роль играют H^+ —АТРа́зы плазматических мембран некоторых типов клеток в почках и в эпителии мочевого пузыря. Они участвуют в трансклеточном переносе кислотных эквивалентов. Для выполнения этой функции также необходим переход $\Delta\psi \rightarrow \Delta\mu H$. В случае H^+/K^+ —АТРа́зы слизистой желудка, также специализированной на функции транспорта кислотных эквивалентов, проблема решается за счет электронейтрального эквивалентного обмена H^+ на K^+ . По-видимому, эта АТРа́за переносит только один ион H^+ на каждую молекулу АТР, что открывает возможность создания очень больших (согласно термодинамическим расчетам, до 7 единиц рН) градиентов концентрации водородных ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой.

В хромаффинных гранулах и некоторых других секреторных пузырьках $\Delta\bar{\mu}H$ -генерирующая функция H^+ —АТРа́зы является ведущей, так как аккумуляция секретируемых веществ поддерживается энергией протонного потенциала. Тем не менее закисление внутривезикулярного пространства может быть также необходимо для функционирования гранул [650].

Глава 5

Потребители $\Delta\bar{\mu}H$

5.1. Химическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$

Описано пять ферментных систем, которые можно рассматривать в качестве потребителей $\Delta\bar{\mu}H$, совершающих химическую работу:

- 1) H^+ —АТР-синтаза,
- 2) H^+ -пирофосфатсинтаза,
- 3) трансгидрогеназа,
- 4) обратная $NADH$ — CoQ -редуктаза,
- 5) обратная $CoQH_2$ -цитохром c -редуктаза.

В первых двух случаях энергия утилизируется для синтеза АТР или PP_i из АДФ и P_i , в трех других — для переноса восстановительных эквивалентов против градиента редокс-потенциала. Среди всех этих систем особенно важной представляется H^+ —АТР-синтаза, ответственная за взаимопревращение основных «конвертируемых валют» живой клетки — мембранной ($\Delta\bar{\mu}H$) и водорастворимой (АТР). Вот почему в настоящее время H^+ —АТР-синтаза относится к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов. С нее мы и начнем эту главу.

5.1.1. H^+ —АТР-синтаза

H^+ —АТР-синтаза — фермент, катализирующий фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом за счет энергии $\Delta\bar{\mu}H$. Обнаружен в митохондриях, хлоропластах, дышащих и фотосинтезирующих бактериях.

В некоторых анаэробных бактериях, таких, как *Streptococcus faecalis*, очень похожий фермент осуществляет обратный процесс ($ATP \rightarrow ADP + P_i + \Delta\bar{\mu}H$). Эта функция рассматриваемой системы, единственная у *S. faecalis*, играет подчиненную роль у аэробных и фотосинтезирующих клеток или органелл.

5.1.1.1. Субъединичное строение

H^+ —АТР-синтазные комплексы из разных источников сходны по своему строению. Каждый из них может быть разделен на два субкомплекса, один из которых отвечает за транспорт протонов (F_0), а другой — за синтез или гидролиз АТР (F_1).

Для H^+ —АТР-синтазы *E. coli* известен субъединичный состав, аминокислотная последовательность и структура оперона (см. обзоры: [293, 802, 1176, 1568]). В этом случае фактор F_1 состоит из пяти субъединиц ($\alpha - \epsilon$), а фактор F_0 — из трех ($a - c$)

Таблица 11. Субъединичный состав H^+ —АТФ-синтазы *E. coli* (по : Брэгг [293])

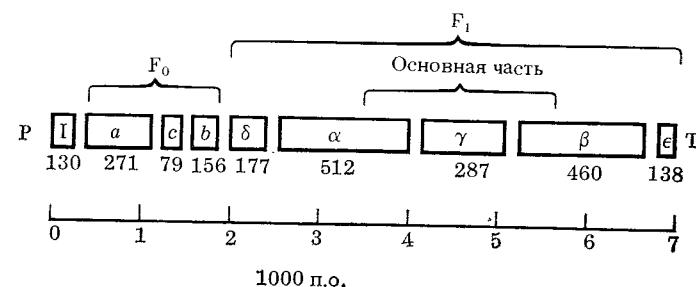
Комплекс	Субъединица	Молекулярная масса, кДа	Число аминокислотных остатков	Количество субъединиц на один F_0F_1
F_1	α	55,0	513	3
	β	50,0	459	3
	γ	31,5	287	1
	δ	19,5	177	1
	ϵ	15,0	138	1
F_0	a	30	271	1
	b	17	156	2
	c	8	79	6—15

(табл. 11). Стехиометрия субъединиц следующая: $3\alpha : 3\beta : \gamma : \delta : \epsilon : a : 2b : (6-15)c$. Молекулярные массы F_1 , F_0 и комплекса F_0F_1 оказались для *E. coli* равными соответственно 384, 112—184 и 593—665 кДа. Неопределенности в оценке массы фактора F_0 и комплекса F_0F_1 обусловлены тем обстоятельством, что мы все еще не можем с точностью ответить на вопрос, сколько субъединиц типа c содержится в одной молекуле H^+ —АТФ-синтазы. В литературе обсуждаются величины от 6 до 15 [293, 802].

Комплекс F_0F_1 *E. coli* кодируется одним опероном, который различные авторы называют по-разному: *unc*, *atr* или *rar*. Его размер порядка 7 т.п.о. В хромосоме *E. coli* оперон локализован на 83-й минуте (см. обзор: [802]). Генетические исследования, а также определение последовательности нуклеотидов в ДНК и опыты по транскрипции и трансляции *in vitro* указывают на присутствие девяти генов в опероне. Их порядок соответствует транскрипции информационных РНК, кодирующих субъединицы I, a , b , c , δ , α , γ , β и ϵ (рис. 72), где символом I обозначен гипотетический белок, который еще не выделен. Мутация по гену I не влияет ни на окислительное фосфорилирование [293, 1029, 1560], ни на рост *E. coli* при $\text{pH} \leq 8,3$. Однако рост мутанта при $\text{pH} > 8,3$ тормозится [1029]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить возможную роль продукта гена I в адаптации *E. coli* к щелочным условиям среды. (Об особенностях энергетического сопряжения у щелочеустойчивых бактерий см. ниже раздел 7.)

Последовательности аминокислот в субъединицах H^+ —АТФ-азы *E. coli* приведены на рис. 73.

Другие прокариоты, располагающие дыхательным или фотосинтетическим фосфорилированием, подобны *E. coli* по субъединичному составу комплекса F_0F_1 . Интересно, что такие анаэробные бактерии, как *Wolinella* (по старой номенклатуре *Vibrio*)

Рис. 72. Структура оперона H^+ —АТФ-синтазы *E. coli*

Рамки считывания показаны квадратами. Цифры под рамками — количество аминокислотных остатков в соответствующей белковой субъединице. Направление считывания генов слева направо;

a , c , ϵ — гены субъединиц фактора F_0 . Основная часть — гены минимального комплекса субъединиц фактора F_1 (α , γ и β), еще способного расщеплять АТФ; δ и ϵ — гены остальных субъединиц F_1 . Р — первый промотор оперона. В рамке I заключены еще два промотора. Роль полипептида 14 кДа, который мог бы кодироваться рамкой 1, неясна (по: Кагава [802])

succinogenes, синтезирующая АТФ при окислении H_2 фумаратом, или *Clostridium thermoaceticum*, способная к автотрофному росту за счет включения CO или CO_2 в ацетат и фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, имеют H^+ —АТФ-синтазу практически того же субъединичного состава, что *E. coli* (см. соответственно [277] и [710]).

Митохондриальная H^+ —АТФ-синтаза построена из субкомплекса F_1 (5 типов субъединиц), субкомплекса F_0 (4 типа субъединиц) и еще четырех дополнительных субъединиц [1567]. При этом как и у *E. coli*, фактор F_1 содержит субъединицы 3α , 3β , γ , δ и ϵ . Крупные субъединицы (α и β) очень напоминают таковые *E. coli*. Так, в β -субъединицах фактора F_1 из митохондрий сердца быка, дрожжей, *E. coli* и хлоропластов содержание консервативных последовательностей составляет около 70% [1296]. Подобная ситуация наблюдается и в случае α -субъединицы [1302].

Сравнение минорных субъединиц факторов F_1 из *E. coli* и животных митохондрий показало, что субъединица γ похожа, а δ и ϵ отличны [1568, 1569]. В то же время в митохондриальной δ -субъединице обнаружены последовательности, гомологичные таковым в ϵ -субъединице *E. coli*.

Ю. А. Овчинников и соавт. [1153] выяснили аминокислотную последовательность так называемого белка, обуславливающего чувствительность к олигомицину (*oligomycin sensitivity coferring protein*, или *OSCP*). Этот компонент служит дополнительной по сравнению с *E. coli* субъединицей в митохондриальной H^+ —АТФ-синтазе. Оказалось, что *OSCP* в основном гомологичен δ -субъединице *E. coli*, но имеет несколько ббльшую молекулярную

α-субъединица	1	50
Хлоропласт табака	MVTIRADEIS NIIRERIEQY NREVKIVNTG TVLQVQDIA RIRGLDEVMA	
Хлоропласт пшеницы	MATLRVDEIH KIVRELIEQY NRKVGIEINIG RVVQVQDIA RIRGLGEIMS	
E.coli	.MQLNSTEIS ELIKQRIQAF NVVSEAHNEG TIVSVSDGVI RIRGLADCMQ	
Rps. blastica	.MGIQAAEIS AILKEQIKNF GKDAEVAEVG RVL SVQDIA RVYGLDNVQA	
Rsp. rubrum	.MEIRAAEIS AILKEQTANF GTEAESAEVQ QVLSVQDIA RVYGLDNVQA	
Митохондрия быка	.EKTGTAEVS SILEERILGA DTSVDLEETS RVL SIGDIA RVHGLRNVQA	
Хлоропласт табака	51 GELVEFEETG IGIALNLESN NVGVVLMQDG LLIQEGSSVK ATGRIPQIPV	100
Хлоропласт пшеницы	GELVEFAEGT RGIALNLESK NVGVVLMQDG LMIQEGSPVK ATGRIPQIPV	
E.coli	GEMISLPNGR YAIALNLERD SVGAVVMGPI ADLAEQMKVK CTGRILEVPV	
Rps. blastica	GEMVEFPGGI RGMALNLEVD NVGIVIFGDD RDIKEGDTVK RIKSIIVDVPA	
Rsp. rubrum	GEMVEFANGV EGMALNLESD NVGIVIFGDD RGIKEGVVK RTQITVDVPA	
Митохондрия быка	GEMVEFSSGL KGMSLNLEPD NVGVVVMQDG KLIKEGIVK RIGALVDVPA	
Хлоропласт табака	101 SEAYLGRVIN ALAKPIDGKG EISASEFRLI ESAAFGIISR RSVYEPLQTG	150
Хлоропласт пшеницы	SEAYLGRVIN ALAKPIDGKG EIIASESRLI ESPAFSIISR RSVYEPLQTG	
E.coli	GRGILLGRVIN TLGAPIDGKG PLDHDGFSAV EAIAPGVTER QSVQDPVQTG	
Rps. blastica	GNGLLGRVVD ALGNPIDGKG PIVASERRIA DVKAPGIIPR KGVHEPMATG	
Rsp. rubrum	GKGLLGRVVD GLGNPIDGKG DLVDVERKRA EVKAPGIIPR KSVHEPVQTG	
Митохондрия быка	GEEL LGRVVD ALGNPIDGKG PIGSKARRRV GLKAPGIIPR ISVREPMQTG	
Хлоропласт табака	151 LKAVDSMPI GRGQRELIIG DRQTGKTAVA LDTILNQKGQ N.....	200
Хлоропласт пшеницы	LKAVDSMPI GRGQRELIIG DRQTGKTAVA LDTILNQKGQ G.....	
E.coli	YKAVDSMPI GRGQRELIIG DRQTGKTALA IDAILNQKRS G.....	
Rps. blastica	LKAVDAMIPI GRGQRELIIG DRQTGKTAVA LDTILNQKVY NDAAGDDESK	
Rsp. rubrum	IKAVDSLPI GRGQRELIIG DRQTGKTAVI LDTILNQKAV NDKAKDDSEK	
Митохондрия быка	IKAVDSLPI GRGQRELIIG DRQTGKTSIA LDTILNQKRF ND..GTDEKK	
Хлоропласт табака	201 .VICMVYVATG QKASSVAQVM TTLQERGAME YTIIVVAETAD SPATLOMLAP	250
Хлоропласт пшеницы	.VICMVYVATG QRASSVAQVM TTFHEEGAME YTIIVVAEMAD SPATLOMLAP	
E.coli	.IKCIYVATG QKASTISNVV RKLEEHGALA NTIVVVAATAS ESAPLOMLAR	
Rps. blastica	KLYCMVYVATG QKRSTVAQLV KKLEETGAMA YTIIVVAATAS DPAPLOMLAP	
Rsp. rubrum	.LFCMVYVATG QKRSTVAQVM KVLADHGALD YTIIVVAATAS EPAPLOMLAP	
Митохондрия быка	KLYCIYVATG QKRSTVAQLV KRLTDADAMK YTIIVVSATAS DAPLOMLAP	
Хлоропласт табака	251 YTGAAALAEYF MYRERHTLII YDDPSKQQA YRQMSLLLR PPGRAYLGD	300
Хлоропласт пшеницы	YTGAAALAEYF MYRERHTLII YDDLKQQA YRQMSLLLR PPGRAYFGD	
E.coli	MPVALMGYF RDRGEDALII YDDLKQQA YRQISLLLR PPGRAYFGD	
Rps. blastica	FSGTAIGYF RDNGRHAMI YDDLKQQA YRQMSLLLR PPGRAYFGD	
Rsp. rubrum	YTGCTMGYF RDNGMHAVIF YDDLKQQA YRQMSLLLR PPGRAYFGD	
Митохондрия быка	YSGCSMGYF RDNGKHALII YDDLKQQA YRQMSLLLR PPGRAYFGD	

Рис. 73. Аминокислотные последовательности субъединиц H^+ -АТФ-синтазы α , β , γ , δ и ϵ фактора F_1 . В рамках консервативные последовательности субъединицы фактора F_1 ; ϵ — субъединицы α , β и γ фактора F_0 (по: Хоппе и Зебальд [739] и Уокер и соавт. [1568])

Хлоропласт табака	301 VFYLHSRLLE RAKLSSSLG E.....	350
Хлоропласт пшеницы	VFYLHSRLLE RAKLNSLLG E.....	
E.coli	VFYLHSRLLE RAA RVNAEYV EAF TKGEVKG KTGS LTALPI IETQAGDVSA	
Rps. blastica	VFYLHSRLLE RAKMNGDFG A.....	
Rsp. rubrum	VFYLHSRLLE RAKLNDDNG A.....	
Митохондрия быка	VFYLHSRLLE RAKMNDAGF G.....	
Хлоропласт табака	351 YIPTNVISIT DGQIFLSADL FNSGIRPAIN VGLSVSRVGS AAQIKAMKQV	400
Хлоропласт пшеницы	YIPTNVISIT DGQIFLSADL FNAGIRPAIN VGLSVSRVGS AAQIKAMKQV	
E.coli	FVPTNVISIT DGQIFLETNL FNAGIRPAIN PGISVSRVGS AAQTKIMKKL	
Rps. blastica	YIPTNVISIT DGQIFLESEL FYGIRPAIN TGLSVSRVGS SAQTSAMKSV	
Rsp. rubrum	YIPTNVISIT DGQIFLETDL FFKGIRPAIN VGLSVSRVGS SAQIKAMKQV	
Митохондрия быка	YIPTNVISIT DGQIFLETFL FYKGIRPAIN VGLSVSRVGS AAQTRAMKQV	
Хлоропласт табака	401 AGKLKLELAQ FAELEAFAPF ASDLDKATQN QLAGQRLE LLKQSQSAPL	450
Хлоропласт пшеницы	AGSKLELAQ FAELEAFAPF ASALDKTSQN QLAGRRLE LLKQSQANPL	
E.coli	SGGIRTALAQ YRELAAPSF ASDLDATRK QLOHCKVTE LLKQKQYAPM	
Rps. blastica	AGKVLELAQ YREMAAFAPF GSDLDASTQA LLNGARLLE LLKQKQYAPL	
Rsp. rubrum	AGSIKLELAQ YREMAAFAPF ASDLDPATQK LLARGARLLE LLKQKQYAPL	
Митохондрия быка	AGTMKLELAQ YREMAAFAPF GSDLDAAATQK LLRGVRLTE LLKQKQYAPL	
Хлоропласт табака	451 TVEEQIMTIY TGNGYLOSL EVGQVRKFLV ELRTYLKTN. KPQFQFISS	500
Хлоропласт пшеницы	PVEEQIATIIY TGTRGYLOSL EIEQVKNFLD ELRKLKDT. KPQFQFISS	
E.coli	SVAQQSLVLF AAERGYLADV ELISKIGSFEA ALLAYVDRDH APLMQEINQ.	
Rps. blastica	TNAEIVCIIF AGTNGYLOKV AVRVDGRFEA GLKHLRTKG KALLDDMTKN	
Rsp. rubrum	AVEEQVCVIF AGTRGYLOKL KTTDVVRFEA SLLGALRTSG ADLL.ESIRT	
Митохондрия быка	AIEEQVAVIY AGVPGYLOKL EPSKTKFEN AFLSHVISQH QALL.GKIRT	
Хлоропласт табака	501 TKTFTEEAEE LLKEAIEQEM DRFILQEQA	529
Хлоропласт пшеницы	SKTFTEQAEI LLKEAIEQL ERFSLQ...	
E.coli	TGGYNDEIEG KLKGILDSFK ATQSW....	
Rps. blastica	DRKVAGDLEK AIRAELDAPA KFA.....	
Rsp. rubrum	GKALSKEIEQ KLVKFLDDFG KFA.....	
Митохондрия быка	DGKISEESDA KLKEIVTNFL AGFE.....	

массу (21 кДа вместо 19,3 кДа δ -субъединицы E. coli), содержит гидрофобный участок вблизи N-концевой последовательности и несколько протяженных отрезков, гомологичных не δ , а β -субъединице E. coli [1152].

Гомологом субъединицы ϵ E. coli в митохондриях служит субъединица 9 (другие названия — протеолипид, связывающий ДЦКД, или протеолипид Бичи — по имени биоэнергетика, открывшего действие ДЦКД на H^+ -АТФ-синтазу [236]).

γ -субъединица	1	50
<i>E. coli</i>	MAGAEIRSK IASVQNTOKI TKAMVMVAAS KMRKSQDRMA ASPPAETMR	
<i>Rps. blastica</i>	MPSLKDLKNN IGSVKNTRKI TKAMVMVAAS KLRRQAQSAE AARPTAERMG	
<i>Rsp. rubrum</i>	MASLKDLRSR ITSVKSTOKI TSAMVMVAAS RLRRQAQDAE AARPTQORME	
Митохондрия быка	.ATLKDITRR LKSTKNIOKI TKAMVMVAAS KYARAERELK PAEMV.....	
<i>E. coli</i>	151 KVIGHLAHGN ..LEYKHPYL EDRDVKRVGY LVV.STDRGL CGGLNINLFLK	100
<i>Rps. blastica</i>	AVIASLASGQ .G.AGAPRL AGNGRDQIHL LVVMTSERGL CGGFNSTIVR	
<i>Rsp. rubrum</i>	RMLGNLAAS AGMAGASPLL GGTGKDNVHL IVALTANRGL CGGFNGSIIR	
Митохондрия быка	.GVGSLALYE KADI.KTP.. FD...KKKHL IIGVSSDRGL CGAIHSSVAR	
<i>E. coli</i>	101 KLLAEMKTWT DKVQCDLAM IESNGYSFF. .NSVGGNVVA QVTGMGDNPS	150
<i>Rps. blastica</i>	LARQRANELV AQKTKVILT VCKGREGQLK RDWASAFVGH VDLSDVRRGL	
<i>Rsp. rubrum</i>	ATRTLRELE AQKTKVLLC ICKKGRDGLK REFPQIIGG IADOSSKAIG	
Митохондрия быка	QMKSEANLA AAKKEVKIIG VCKSIRSLH RTHSDQFLVT FKEVGRRPPT	
<i>E. coli</i>	151 LSELIGPVKV MLOAYDEGRL DKLYIVSKK INTMSQVPTI SOLLPLPAS.	200
<i>Rps. blastica</i>	YSNAQGIARE VLAAFEAGEA DVVTIFYNRF QSVISOVETA QQVIPA....	
<i>Rsp. rubrum</i>	FSDADRESRL ILMFQAGEF DVCTLVYNNF QSALSOVTR QQIIPFAVPT	
Митохондрия быка	FGDASVIALE LNSGYEFD. EGSIIF.NRF RSVIYKTEE KPIF.....	
<i>E. coli</i>	201DDDD LKHKSWDYLY EPDPKALDIT LLRRYVESQV YQGVVENLAS	250
<i>Rps. blastica</i>	KFE AÄETNALYDY EPSEEAILAD LLPRGVATQI FTALLANAAS	
<i>Rsp. rubrum</i>	TVAGNDNDR TAGPKAIYEV EPSEEEIAD LLPKNVAIQV FRGMLSEFAS	
Митохондрия быка	SLDT ISSAESMSIN DDIDADVLRN YQEYSLANII YYSKSESTTS	
<i>E. coli</i>	251 EQGARMAMK APTINGGSLT KETQLVYKKA ROASTITELT EIVSGAARV	300
<i>Rps. blastica</i>	EQGARMAMK NATRNAGDMI NKLTIQYNNR ROASTITELT EIVSGAARV	
<i>Rsp. rubrum</i>	EQGARMAMK NATRNAGDMI KKLSTLYNRT ROASTITELT EIVSGAARV	
Митохондрия быка	EQGARMAMK NATRNAGDMI KKLSTLYNRT ROASTITELT EIVSGAARV	
δ -субъединица		
<i>E. coli</i>	1MSE FITVARPVAK IAPDFAVEHQ SVERWYD.ML AFAAEVTKNE	50
<i>Rps. blastica</i>	...MAEAASI SQGIAERYAT ALFELSKETG.ALTLETDDID ALKDLVLAGSP	
<i>Rsp. rubrum</i>	...MSSHKAG VTGVAERYAT ALYELAEDRG ALDQVSADLR SLKAMLDSESG	
Митохондрия быка	FAKLVPPPVQ IYGIQGRYAT ALYSAASKQN KLEQVEKELL RV.GQILKEP	
<i>E. coli</i>	51 QM.AELLSGA LAPETLAESF LAVCGEQ.LD ENGQILIRVM AENGRLNALP	100
<i>Rps. blastica</i>	DLGAMIASPV ISRGDQAKAV AAIAGKMGLS PLMTNLTALM SEKRRLFALP	
<i>Rsp. rubrum</i>	DLRRVIAISPV IGRDDQKAL TALAERAGFH EIVRNFLGVV AAKHRSFAVP	
Митохондрия быка	KMAAELLNPY VKRSVKVKS L SDMTAKEKFS PLTSLINLL AENGRLNTPT	
<i>E. coli</i>	101 DVLEQFTHLR AVSEATAEVD VISAAITSEQ QLAKISAAME KRLSR.KV.K	150
<i>Rps. blastica</i>	QVLSALAGLI AEEKGEVTAE VTAATKLUSAA QAKKLAETLK AKVGK.TV.K	
<i>Rsp. rubrum</i>	GMIGAFLERL AARRGEVTAR IVSATALTSA QKSALTALN KATGN.TV.T	
Митохондрия быка	AVISAFSTMM SVHRGEVPCT VTASALNEA TLTELTATVTK SFLKKGQULK	
<i>E. coli</i>	151 LNCKTKSVAM AGVITRAGDM VIDSSVRGL ERHADVLQS.	191
<i>Rps. blastica</i>	LNTTIDESLI GGLIVKLST MIVSVKSKL ASLQNAKREV G	
<i>Rsp. rubrum</i>	IDASVDFALL GGVVVRGSR MVDSSSLTKL KRLQLAMKGV G	
Митохондрия быка	LEVKIDPSIM GGVVVRGSR MVDSSSLTKL KRLQLAMKGV L	

ϵ -субъединица	1	50
Хлоропласт табака	MTLNLVS LTPNRIVW.D SEVEEIVLST NSQIGILPN	
Хлоропласт шпината	MTLNLVC LTPNRSIW.N SEVKEIILST NSQIGVLPN	
Хлоропласт ячменя	MKLNLVY LTPKRIIW.D CEVKEIILST NSQIGVLPN	
Хлоропласт пшеницы	MKLNLVY LTPKRIIW.D CEVKEIILST NSQIGVLPN	
Хлоропласт кукурузы	MKLNLVY LTPKRIIW.D CEVKEIILST NSQIGVLPN	
<i>E. coli</i>	MAMTYHLDV VSAEQQMF.S GLVEKIQVTG SESEGLGIYPG	
<i>Rps. blastica</i>	MAATLQFDL VSPERRLA.S VQATEVQIPG AAGDMTAMQG	
<i>Rsp. rubrum</i>	MAETTEFEL VSPERLLF.S EPVEMVVVPG TDCDFGAMPR	
δ быка	AEAAAAQAPA AGPGQMSFTF ASPTQVFNS ANVRQVDVPT QTCAFGLAA	
δ N.crassa	YAEAVA ...DKIKLSL SLPHQAIYKS QDVVQVNTPA VSEMGVLAN	
Хлоропласт табака	51 HAPITATAVDI GILRL.ND QWLTALMGG FA.RIGNNEI TVLVNDAEKG	100
Хлоропласт шпината	HAPTATAVDI GILRL.ND QWLTALMGG FA.RIGNNEI TVLVNDAERG	
Хлоропласт ячменя	HAPINTAVDM GILRL.LND QWLTAVLWSG FA.RIVNNEI IILGNDAELG	
Хлоропласт пшеницы	HAPINTAVDM GILRL.LND QWLTAVLWSG FA.RIVNNEI IILGNDAELG	
Хлоропласт кукурузы	HAPINTAVDM GILRL.LND QWLTAVLWSG FA.RIVNNEI IILGNDAELG	
<i>E. coli</i>	HAPLLTAIKP GILRIVKQHG HEEFTYLSGG IL.EVQPGNY TVLADTAIRG	
<i>Rps. blastica</i>	HAPTITTLRP GILRAVSAGG .TKAYVVTGG FA.EISATGV SVLAERAVPL	
<i>Rsp. rubrum</i>	HAPLLSTVRP GVISTYNGCK VQRRIFVAGG FA.EVTEDCR TVLADFAIDL	
δ быка	HVPTLQVLRP GLVVVHAEDG TTSKYEVSSG SVTVNADSSV QLLAEAEVTL	
δ N.crassa	HVSTIEQLKP GLVEVIEESG SNKQYFLSGG FAVVQPGSKL SINAVEGYAL	
Хлоропласт табака	101 SDIDPQEAQQ TLELAEANVK KA..EGRR.. .Q.KIEANLA LRRARTRVEA	150
Хлоропласт шпината	SDIDPQEAQQ TLEIAEANLR KA..EGKR.. .Q.KIEANLA LRRARTRVEA	
Хлоропласт ячменя	SDIDPEAQK ALEIAEANLS KA..FGTK.. .D.LVEAKLA LRRARIRIEA	
Хлоропласт пшеницы	SDIDPEAQK ALEIAEANLS KA..EGTK.. .D.LVEAKLA LRRARIRIEA	
Хлоропласт кукурузы	SDIDPEAQK ALEIAEANLS KA..EGTK.. .D.LVEAKLA LRRARIRIEA	
<i>E. coli</i>	QDLDEARAME AKRKAEEHIS SS..HG...D VD.YAQASAE LAKATAQLRV	
<i>Rps. blastica</i>	DEMD.AKLM.D QLVADASAA SS..VG...D VD.KDTA..E .KAMSDLQA	
<i>Rsp. rubrum</i>	ASL.SEEAVR A.RLQAADDR LK..EAT.SE AE.KAEAAQA ..KAIAEALL	
δ быка	DMLDLGAAGA NLEKAQSELL GADEATRAE IQIRIEANEA LVKALE...	
δ N.crassa	EDFSAEAVRA QIAEAQKIVS GGGSQDDIAE AQVELEVLES LQAVLK...	
Хлоропласт табака	151 158 INPIS...	
Хлоропласт шпината	SENTISS..	
Хлоропласт ячменя	VNWIPPSN	
Хлоропласт пшеницы	VNWIPPSN	
Хлоропласт кукурузы	VNWIPPSN	
<i>E. coli</i>	IELTKKAM	
<i>Rps. blastica</i>	NKAAAGF.	
<i>Rsp. rubrum</i>	AARKG...	
δ быка		
δ N.crassa		

Последовательности, гомологичные субъединице α *E. coli*, были обнаружены в субъединице 6 (масса 22 кДа, другие названия — фактор F_2 и фактор В).

Есть пять полипептидов, ассоциированных с H^+ —АТФ-синтазой митохондрий, которые отсутствуют у бактерий, а именно: 1) ϵ -субъединица фактора F_1 с массой 5,5 кДа [1568]; 2) субъединица AL6 фактора F_0 [1567]; 3) фактор F_6 (9 кДа) [548]; 4) белковый ингибитор фактора F_1 с массой 9,5 кДа [802] и 5) недавно описанная Уокером и соавт. [1567] субъединица с массой

5	10	15	20
f-Met-Ala-Ser-Glu-Asn-Met-Thr-Pro-Gln-Asp-Tyr-Ile-Gly-His-His-Leu-Asn-Asn-Leu-Gln-			
25	30	35	40
Leu-Asp-Leu-Arg-Thr-Phe-Ser-Leu-Val-Asp-Pro-Gln-Asn-Pro-Ala-Thr-Phe-Trp-Thr-			
45	50	55	60
Ile-Asn-Ile-Asp-Ser-Met-Phe-Phe-Ser-Val-Val-Leu-Gly-Leu-Leu-Phe-Leu-Val-Leu-Phe-			
65	70	75	80
Arg-Ser-Val-Ala-Lys-Lys-Ala-Thr-Ser-Gly-Val-Pro-Gly-Lys-Phe-Gln-Thr-Ala-Ile-Glu-			
85	90	95	100
Leu-Val-Ile-Gly-Phe-Val-Asn-Gly-Ser-Val-Lys-Asp-Met-Tyr-His-Gly-Lys-Ser-Lys-Leu-			
105	110	115	120
Ile-Ala-Pro-Leu-Ala-Leu-Thr-Ile-Phe-Val-Trp-Val-Phe-Leu-Met-Asn-Leu-Met-Asp-Leu-			
125	130	135	140
Leu-Pro-Ile-Asp-Leu-Leu-Pro-Tyr-Ile-Ala-Glu-His-Val-Leu-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Arg-			
145	150	155	160
Val-Val-Pro-Ser-Ala-Asp-Val-Asn-Val-Leu-Ser-Met-Ala-Leu-Gly-Val-Phe-Ile-Leu-			
165	170	175	180
Ile-Leu-Phe-Tyr-Ser-Ile-Lys-Met-Lys-Gly-Ile-Gly-Gly-Phe-Thr-Lys-Glu-Leu-Thr-Leu-			
185	190	195	200
Gln-Pro-Phe-Asn-His-Trp-Ala-Phe-Ile-Pro-Val-Asn-Leu-Ile-Leu-Gly-Val-Ser-Leu-			
205	210	215	220
Leu-Ser-Lys-Pro-Val-Ser-Leu-Gly-Leu-Arg-Leu-Phe-Gly-Asn-Met-Tyr-Ala-Gly-Glu-Leu-			
225	230	235	240
Ile-Phe-Ile-Leu-Ile-Ala-Gly-Leu-Leu-Pro-Trp-Trp-Ser-Gln-Trp-Ile-Leu-Asn-Val-Pro-			
245	250	255	260
Trp-Ala-Ile-Phe-His-Ile-Leu-Ile-Ile-Thr-Leu-Gln-Ala-Phe-Ile-Phe-Met-Val-Leu-Thr-			
265	270		
Ile-Val-Tyr-Leu-Ser-Met-Ala-Ser-Glu-Glu-His			

β-субъединица

5	10	15	20
f-Met-Asn-Leu-Asn-Ala-Thr-Ile-Leu-Gly-Gln-Ala-Ile-Ala-Phe-Val-Leu-Phe-Val-Leu-Phe-			
25	30	35	40
Cys-Met-Lys-Tyr-Val-Trp-Pro-Pro-Leu-Met-Ala-Ala-Ile-Glu-Lys-Arg-Gln-Lys-Glu-Ile-			
45	50	55	60
Ala-Asp-Gly-Leu-Ala-Ser-Ala-Glu-Arg-Ala-His-Lys-Asp-Leu-Asp-Leu-Ala-Lys-Ala-Ser-			
65	70	75	80
Ala-Thr-Asp-Gln-Leu-Lys-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Glu-Gln-Ala-Asn-			
85	90	95	100
Lys-Arg-Arg-Ser-Gln-Ile-Leu-Asp-Glu-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Gln-Glu-Arg-Thr-Lys-			

γ-субъединица

5	10	15	20
f-Met-Glu-Asn-Leu-Asn-Met-Asp-Leu-Leu-Tyr-Met-Ala-Ala-Ala-Val-Met-Met-Gly-Leu-Ala-			
25	30	35	40
Ala-Ile-Gly-Ala-Ala-Ile-Gly-Ile-Gly-Ile-Leu-Gly-Gly-Lys-Phe-Leu-Glu-Gly-Ala-Ala-			
45	50	55	60
Arg-Gln-Pro-Asp-Leu-Ile-Pro-Leu-Leu-Arg-Thr-Gln-Phe-Phe-Ile-Val-Met-Gly-Leu-Val-			
65	70	75	
Asp-Ala-Ile-Pro-Met-Ile-Ala-Val-Gly-Leu-Gly-Leu-Tyr-Val-Met-Phe-Ala-Val-Ala			

5.1. Химическая работа за счет ΔμH

217

18,5 кДа, которая наряду с F₆ и OSCP необходима для правильного связывания F₁ с F₀.

Еще один белок (около 30 кДа), обычно сопутствующий митохондриальной H⁺—АТР-синтазе, оказался АТР/АДР-антипортером [788] (см. ниже раздел 5.2.7.2).

Сравнение субъединичного состава комплексов F₀F₁ из E. coli и митохондрий приведено в табл. 12.

У животных и дрожжей все субъединицы фактора F₁ закодированы в ядерном геноме и синтезируются в цитоплазме в виде несколько более крупных предшественников. У растений α-субъединица кодируется в митохондриях, β — в ядре, а место синтеза малых субъединиц фактора F₁ остается невыясненным [289].

Среди компонентов фактора F₀ дрожжей митохондриальным геномом кодируются субъединицы 6 и 9. Все прочие субъединицы имеют соответствующие гены в ядре. В геноме митондрий животных обнаружены два перекрывающихся гена, имеющих отношение к H⁺—АТР-синтазе. Они кодируют субъединицы 6 и AL6 [802, 1567].

Субъединицы 6,9 и AL6 относятся к разряду протеолипидов. Они растворимы в смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и могут быть экстрагированы этим растворителем из комплекса митохондриальной H⁺—АТР-синтазы.

Субъединичный состав H⁺—АТР-синтазы хлоропластов, обозначаемой CF₀CF₁, в основном подобен таковому у бактерий и митохондрий (3α, 3β, γ, δ, ε). При этом ε-субъединица гомологична таковой бактериального типа. Фактор CF₀ содержит четыре типа субъединиц, обозначаемых I—IV. Субъединицы IV, I и III гомологичны субъединицам a, b и c фактора F₀ E. coli. Субъединица II не имеет бактериального аналога [710].

Таблица 12. Сравнение субъединичного состава H⁺—АТР-синтазы E. coli и животных митохондрий (по: Овчинников и соавт. [1153] и Уокер и соавт. [1568, 1567])

Комп-лекс	E. coli	Митохондрии животных
F ₁	α	α
	β	β
	γ	γ
	δ	δ
	ε	ε
F ₀	Нет аналога.	Нет аналога.
	a	Субъединица 6 = F ₂ = F _B
	b	b
	c	Субъединица 9 = ДПКД-связывающий протеолипид AL6
	Нет аналога	Нет аналога
Нет аналога		F ₆
Нет аналога		d
Нет аналога		Белковый ингибитор

Примечание. Стрелки указывают наличие гомологий в аминокислотных последовательностях субъединиц двух объектов.

Субъединицы α , β , ϵ , I, III и IV синтезируются в хлоропластах, причем гены β и ϵ связаны воедино [710, 802, 1019, 1576, 1587].

Молекулярные массы и аминокислотные последовательности субъединиц фактора CF_1 несколько отличаются от гомологичных полипептидов из животных, дрожжей, бактерий и растений [1568]. В частности, было установлено, что субъединицы фактора F_1 из митохондрий, сосуществующих с хлоропластами в одной и той же растительной клетке, отличаются по антигенным детерминантам от гомологичных субъединиц фактора CF_1 [1441].

У цианобактерий, располагающих в тилакоидной мембране как дыхательной, так и фотосинтетической цепью, фактор F_1 оказался того же типа, что в хлоропластах [715, 1567].

5.1.1.2. Трехмерная структура и расположение в мембране

H^+ —АТФ-синтазный комплекс так велик, что далеко выдается в воду с одной стороны мембраны. Выступающая часть, представляющая собой фактор F_1 , обращена в цитоплазму бактерий, матрикс митохондрии или строму хлоропласта.

Негативное окрашивание вывернутых субмитохондриальных пузырьков выявляет грибовидные выросты диаметром около 9 нм, располагающиеся по всей поверхности мембраны (рис. 74). Как показал Ракер [1223], выросты исчезают после сильного механического перемешивания суспензий пузырьков, что сопровождается потерей способности пузырьков синтезировать и расщеплять АТФ, а также появлением в растворе сферических частиц размером в 9 нм и АТРазной активности. Реконструкция сферических частиц с мембраной пузырьков возвращает последним АТФ-синтазную и АТРазную активности. Из этих наблюдений Ракер заключил, что выступы представляют собой каталитическую часть H^+ —АТФ-синтазы, т. е. фактор F_1 . Впоследствии это заключение было подтверждено электронным микрофотографированием субмитохондриальных пузырьков, обработанных антителами к фактору F_1 , а также несколькими другими независимыми способами (см. обзоры: [134, 1223, 1225, 1531]).

После отщепления фактора F_1 в мембране остается часть H^+ —АТФ-синтазы, ответственная за перенос ионов H^+ (фактор F_0). Чтобы реконструировать H^+ —АТФ-синтазу в протеолипосомах, требуются как F_1 , так и F_0 [134, 1225, 1421].

Трехмерная структура изолированного фактора F_1 митохондрий была исследована у нас В. Л. Цуруном и соавт. [1530], а также Боекма и соавт. [274]. Результат компьютерного анализа электронных микрофотографий фактора F_1 показан на рис. 75. В целом, структура митохондриального фактора F_1 оказалась подобной таковой аналогичного компонента *L. casei* (см. выше раздел 4.2). Было найдено, что шесть белковых масс, представля-

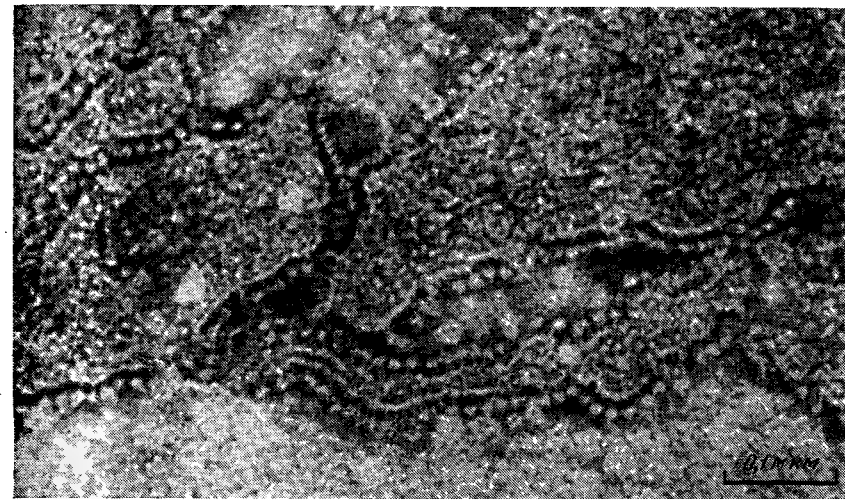


Рис. 74. Негативное контрастирование вывернутых субмитохондриальных пузырьков. На внешней поверхности мембраны видны многочисленные грибовидные выросты (фото Л. Е. Бакеевой)

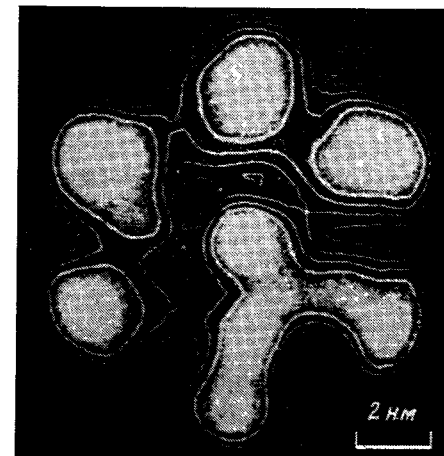


Рис. 75. Структура изолированного фактора F_1 из митохондрий сердца быка

Негативный контраст. Электронно-микроскопические фотографии 37° проекций пяти основных типов были суммированы с использованием системы анализа изображений (по: Боекма и соавт. [274])

ющих собой, по-видимому, крупные субъединицы (три α и три β), упакованы в два слоя по три субъединицы в каждом слое. Фронтальная проекция фактора F_1 имеет диаметр порядка 10 нм. В центральной части митохондриального F_1 иногда удается наблюдать еще одну, седьмую белковую массу, которая могла бы быть комплексом трех мелких субъединиц [274].

Исследование, проведенное Парадизом и Шмидтом [1168] с использованием малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, показало, что фактор F_1 можно приблизительно описать как эллипсоид с осями $12 \times 9 \times 7$ нм.

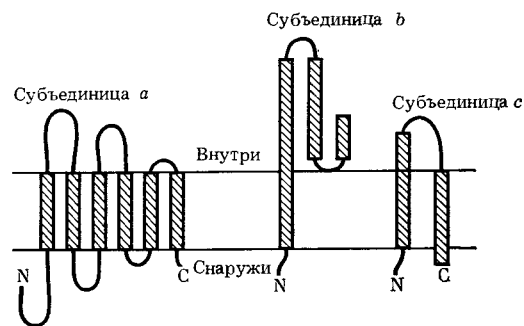


Рис. 76. Гипотетическая схема расположения субъединиц фактора F_0 в мембране *E. coli*

Схема основывается на анализе соотношения гидрофобных и гидрофильных участков полипептидной цепи. Заштрихованы предполагаемые α -спиральные структуры (по: Брэгг [293])

Проблема точного расположения отдельных субъединиц в факторе F_1 еще ждет своего решения. Ряд предложенных моделей был рассмотрен Брэггом и Хоу [294].

Многое неясно также в вопросе о том, как F_1 крепится к фактору F_0 , погруженному в мембрану. Были получены данные, что по крайней мере β -субъединица фактора F_1 может находиться в прямом контакте с фосфолипидами. Это наблюдение противоречит принятой точке зрения, что H^+ —АТФ-синтаза всегда выглядит как гриб, шляпка которого соединяется с мембранным сектором посредством довольно длинной ножки [1223]. Не исключено, что грибовидная конфигурация, видная на рис. 74, фиксируется в результате обработки, предшествующей анализу под электронным микроскопом [134, 1421]. В принципе проблема могла бы быть решена с использованием метода замораживания и скалывания образцов, скажем, интактных митохондрий. Однако полученные таким способом картины слишком сложны, чтобы лечь в основу какого-либо окончательного суждения о расположении фактора F_1 .

Существует лишь весьма косвенная информация о трехмерной структуре фактора F_0 . Ее источником служит, в частности, рассмотрение чередований гидрофобных и гидрофильных участков аминокислотных последовательностей, составляющих фактор субъединиц (см. обзоры: [293, 739, 1350]). На рис. 76 приведен пример гипотетической схемы, основанной на таком рассмотрении. Согласно схеме, очень гидрофобные a - и c -субъединицы образуют соответственно шесть и две α -спиральные трансмембранные колонны. Что касается b -субъединицы, то она пересекает мембрану только один раз и содержит девять остатков лизина и аргинина в предположительно α -спиральных участках, обращенных в цитоплазму бактериальной клетки. Эти участки легко атакуются протеазами.

Расположение субъединиц, показанное на рис. 76, подкрепляется также опытами с антителами и гидрофобными или гидрофильными модификаторами белков (см. обзор: [293]).

Приняв, что b -субъединица имеет конформацию, показанную на рис. 76, можно рассчитать, как далеко она выдается из мембраны в цитоплазму. Это расстояние оказывается порядка 8 нм.

Есть сведения, что именно b -субъединица связывает фактор F_1 с мембраной. Со стороны фактора F_1 в этом связывании, вероятно, участвуют субъединицы γ , δ и ϵ . Так, согласно данным Каназавы и соавт. [814], делеция последовательности ²²LysAlaMetGluMetValAla²³ из N-концевой части γ -субъединицы *E. coli* приводит к полной потере способности фактора F_1 связываться с мембраной.

Что касается β -субъединицы, то при обработке химическими сшивающими агентами она соединяется с субъединицами a и b [184]. Показано также, что фактор F_1 препятствует расщеплению b -субъединицы протеазами. В то же время отщепление вынесенных в воду участков b -субъединицы в отсутствие фактора F_1 снижает сродство F_1 к мембране, причем связавшись, фактор F_1 уже не может контактировать с протонпроводящим путем фактора F_0 [293, 736].

Фактор F_1 прочно связывает добавленную c -субъединицу. В этом процессе участвуют β - и α -субъединицы. Связывание исчезает после химической модификации остатков аргинина в полярной связке между двумя α -спиральными колоннами c -субъединицы, а также после обработки этой субъединицы специфическими антителами [293].

В митохондриях конфигурация и функция b -субъединицы приписываются белку OSCP [1152]. Показано, что OSCP взаимодействует с α - и в меньшей степени с β -субъединицами фактора F_1 [514].

5.1.1.3. Гидролиз АТФ изолированным фактором F_1

Фактор F_1 , будучи отделен от мембранного сектора H^+ —АТФ-синтазы, сохраняет способность гидролизовать АТФ до АДФ и фосфата. Реакция протекает с очень большой скоростью и утрачивает чувствительность к олигомицину, диэтилстильбэстролю и низким концентрациям ДЦКД, отличаясь в этом отношении от комплекса F_0F_1 .

Гидролиз АТФ растворимым фактором F_1 был исследован в целом ряде лабораторий, однако и сегодня многие существенные моменты механизма этой реакции остаются неясными.

Твердо установлено, что фактор F_1 может связывать шесть молекул адениннуклеотидов, т. е. по одному на каждую крупную субъединицу [134, 1421].

Как α -, так и β -субъединицы фактора F_1 содержат весьма консервативные последовательности, подобные тем, что найдены в других АТФ-связывающих ферментах [293, 1570]. Из шести мест связывания три гораздо быстрее обменивают связанные нуклео-

тиды, чем три других места. Поэтому в факторе F_1 различают прочно и слабо связанные нуклеотиды [134, 293, 1421].

Имеется несколько косвенных указаний на то, что активный центр фактора F_1 расположен на β -субъединице. Недавно появилось сообщение [687], что изолированная β -субъединица фактора F_1 из *Rhodospirillum rubrum* гидролизует, хотя и очень медленно, АТР до АДФ и фосфата. Гидролиз тормозится такими специфическими ингибиторами фактора F_1 , как ауовертин и эфрапептин. Первый из них снижал АТРау в пять раз, второй — втрое. Такая же степень торможения активности наблюдалась на интактном F_1 . $V_{\max}$ и K_m для гидролиза Mg^{2+} —АТР β -субъединицей и фактором F_1 были того же порядка. Однако $V_{\max}$ для расщепления Ca^{2+} —АТР оказалась в 400 раз ниже в случае β -субъединицы, чем фактора F_1 . Фактически β -субъединица расщепляла Ca^{2+} —АТР так же медленно, как Mg^{2+} —АТР. Кроме того, активация АТРау сульфитом и ее ингибирование азидом наблюдались только на факторе F_1 , но не на β -субъединице. В отличие от фактора F_1 β -субъединица не содержала связанных нуклеотидов.

Все эти наблюдения подобны таковым, сделанным при исследовании фактора F_1 в условиях, когда заполняется только один каталитический центр [653] (так называемый одноцентровый катализ). Связывание АТР во втором месте вызывает многократное ускорение реакции, что обусловлено возрастанием скорости освобождения продуктов (АДФ и фосфата) из активного центра.

Приняв, что β -субъединицы несут каталитические центры, мы должны предположить, что все другие субъединицы фактора F_1 имеют регуляторные или какие-то иные функции. В этой связи можно напомнить, что фактор F_1 из *Lactobacillus casei* (см. выше раздел 4.2) состоит из тех же крупных субъединиц, что и из *E. coli*, катализирует быстрый гидролиз АТР *in vitro* и действует *in vivo* в основном или даже исключительно как АТРаза, хотя может синтезировать АТР на искусственно созданной $\Delta\psi$. Из этих наблюдений можно заключить, что: 1) комплекс шести крупных субъединиц ($3\alpha + 3\beta$) необходим для быстрой скорости реакции, катализируемой фактором F_1 , и 2) наличие двух типов крупных субъединиц обязательно для достижения высокой скорости гидролиза и синтеза АТР как таковых.

Может быть, гетерогенность крупных субъединиц в H^+ —АТР-синтазе необходима для улучшения кинетических характеристик процесса синтеза АТР. В то же время весьма вероятны также эффекты регуляторной природы. Дело в том, что очень активная H^+ —АТР-синтаза, действуя в обратном (гидролитическом) направлении, может практически немедленно исчерпать весь запас АТР в клетке. К счастью, расщепление АТР H^+ —АТР-синтазой сдерживается генерируемым ею протонным потенциалом, когда $\Delta\bar{p}H$ достигает величины, эквивалентной энергии гидролиза АТР

(феномен протонного контроля). Тем не менее этот регуляторный механизм не всегда достаточен, так как иногда высокая $\Delta\bar{p}H$ не может поддерживаться вследствие повреждения мембраны или активации природной разобщающей системы (см. ниже раздел 5.4.2). В таких условиях могут помочь аллостерические регуляторы. По крайней мере два таких регулятора действуют на уровне фактора F_1 . Это АДФ и белковый ингибитор.

Как показали А. Д. Виноградов и соавт. [1039, 1559], гидролиз АТР изолированным митохондриальным фактором F_1 сильно тормозится одним из продуктов реакции — АДФ. По данным, полученным в нашей группе Я. М. Мильгромом и М. Б. Мураталиевым [92], это торможение обусловлено АДФ, связанным в некаталитическом центре фактора F_1 .

Примечательно, что торможение посредством АДФ отсутствует при гидролизе АТР изолированной β -субъединицей фактора F_1 из *Rh. rubrum* [687]. В этой связи интересно было бы выяснить, как действует АДФ на фактор F_1 из *L. casei* (см. обсуждение [91]).

Естественный механизм удаления АДФ из ингибированного фактора F_1 требует $\Delta\bar{p}H$ [377, 881, 1408]. Это означает, что торможение посредством АДФ может развиваться только в том случае, если $\Delta\bar{p}H$ снижен, т. е. именно тогда, когда есть опасность истощения фонда АТР в клетке.

В митохондриях ту же функцию, что АДФ, может выполнять особый полипептид—белковый ингибитор [581]. В хлоропластах, он по-видимому, идентичен ϵ -субъединице [560].

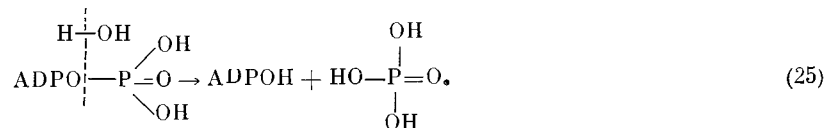
Подобно АДФ, белковый ингибитор подавляет АТРау активность изолированного фактора F_1 , а также комплекса F_0F_1 в мембране в условиях, когда $\Delta\bar{p}H$ снижен (см. обзоры: [881, 1340]).

Вероятно, роль α -субъединицы не ограничивается регуляцией активности β -субъединицы. Как было постулировано в нашей группе [134, 1421], связывание АТР, АДФ и фосфата с α -субъединицей может служить промежуточным этапом транслокации этих гидрофильных веществ из воды в активный центр β -субъединицы, локализованный в гидрофобной области (см. ниже раздел 5.1.1.8). Что же до мелких субъединиц (γ , δ , ϵ), то они могут быть вовлечены как в регуляцию, так и в организацию комплекса F_0F_1 . По Кагаве, комплекс α -, β - и γ -субъединиц представляет собой минимальную систему, все еще способную к быстрому гидролизу АТР [799]. В то же время сумма γ -, δ - и ϵ -субъединиц достаточна для блокирования пассивной утечки протонов через фактор F_0 в субклеточных пузырьках бактерий, предварительно лишенных фактора F_1 [799]. Это и некоторые другие наблюдения свидетельствуют о том, что мелкие субъединицы фактора F_1 участвуют в его прикреплении к F_0 .

Сравнение аминокислотных последовательностей факторов F_1 из митохондрий, хлоропластов и бактерий показало, что в β -субъ-

единице есть гомологичные последовательности, образующие два кластера — кислый и основной: AspGluLeuSerGluGluAsp и ArgAlaArgLysIleXArg (соответственно остатки 381—387 и 393 и 399 в факторе F_1 из *E. coli*) [1282]. Кагава полагает [801], что перенос протонов происходит от F_0 к основному и далее к кислому кластеру внутри молекулы F_1 . По его схеме, этот эффект приводит к конформационному изменению фактора F_1 , вызывающему освобождение протонов и синтезированного АТР в водную среду, омывающую ту поверхность мембраны, куда обращен F_1 . Схема Кагавы нуждается в дальнейшем исследовании. Однако уже сейчас ясно, что карбоксильные и аминные группы, а также остатки тирозинов как-то вовлечены в механизм гидролиза АТР фактором F_1 [293, 801, 802]. Один из существенных карбоксиллов фактора F_1 модифицируется ДЦКД. Этот эффект следует отличать от тормозящего действия ДЦКД на протонную проводимость фактора F_0 , развивающегося при меньших концентрациях ингибитора [1200].

Несколько независимых линий доказательства свидетельствуют о том, что гидролиз АТР в каталитическом центре F_1 происходит путем прямой атаки молекулой воды ангидридной связи АТР, как это показано в уравнении (25):



Процесс протекает без образования ковалентных интермедиатов. Об этом свидетельствуют как данные опытов по изотопным обменам, так и факт, что гидролиз АТР фактором F_1 устойчив к ванадату, гидроксиламину и другим реагентам на ацилфосфат [134, 1421, 1579].

5.1.1.4. Синтез связанного АТР изолированным фактором F_1

В 1982 г. Фелдман и Сигмэн [553] показали, что фактор CF_1 , изолированный из хлоропластов, может синтезировать АТР из прочно связанного АДФ в ответ на добавление в раствор неорганического фосфата. Синтезируемый АТР оставался связанным с CF_1 , был недоступен для гексокиназы и мог быть переведен в раствор только путем денатурации фактора CF_1 . Позднее те же авторы продемонстрировали синтез связанного АТР полностью дезэнергизованными хлоропластами [554], подтвердив в этой системе предположение, сделанное за десять лет до них Кроссом и Бойером, исследовавшими разобщенные митохондрии [413]. В 1983 г. Сакамото и Тонокура [1292] сообщили о синтезе связанного АТР из АДФ и фосфата, добавленных к раствору митохондриального фактора F_1 . Процесс резко стимулировался 30%-ным диметилсульфоксидом.

Эти наблюдения показывают, что $\Delta\bar{p}H$ требуется скорее для удаления АТР из активного центра F_1 (или прочного связывания АДФ и P_i с этим центром), чем для синтеза АТР как такового.

Стимулирующий эффект диметилсульфоксида может объясняться снижением активности воды в каталитическом центре (что должно сдвинуть влево равновесие реакции $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + P_i$), а также повышением сродства этого центра к фосфату [1291]. Здесь уместно отметить, что образование E_2-P [442] и АТР [378] из добавленных фосфата и АДФ было показано в опытах на очищенной Ca^{2+} -АТФазе в присутствии высокой концентрации диметилсульфоксида.

Теоретический расчет, сделанный в нашей группе [1422], показывает, что константа равновесия гидролиза АТР в каталитическом центре фактора F_1 не превышает 100, а, по всей вероятности, близка к 1. Это означает, что синтез *связанного* АТР требует гораздо меньшего количества энергии, чем синтез *свободного* АТР в растворе.

Представляется возможным даже, что практически вся энергия тратится на стадии освобождения АТР (или связывания АДФ и фосфата), как это было впервые предположено Бойером [292] (см. также ниже раздел 5.1.1.8).

5.1.1.5. Проведение протонов через фактор F_0

Удаление фактора F_1 из тилакоидов, хромофоров, суббактериальных или субмитохондриальных пузырьков приводит к появлению протонной проводимости через фактор F_0 . Протеолипосомы с фактором F_0 также имеют высокую проводимость по протонам. Эффект снимается добавлением специфического блокатора F_0 — ДЦКД. Реконструкция фактора F_0 с фактором F_1 также подавляет утечку протонов (см. обзоры: [134, 293, 584, 1421]).

В опытах с бактериями показано, что мутация по любой из трех субъединиц фактора F_0 приводит к потере его способности проводить протоны [183, 293, 584, 590, 1199]. Весьма вероятно, что *c*-субъединица прямо участвует в переносе H^+ . В *c*-субъединице фактора F_0 есть остаток дикарбоновой кислоты, абсолютно необходимый для переноса протонов. Он располагается на расстоянии 1,8 нм от поверхности мембраны, т. е. примерно в середине гидрофобного барьера [1212]. В *E. coli* остаток, о котором идет речь, — это Asp-61. Его модификация посредством ДЦКД [1095] или замена на Asp или Glu [737, 738] полностью прекращает как транспорт H^+ , так и синтез АТР за счет $\Delta\bar{p}H$. В *c*-субъединице из других бактерий, а также в субъединице 9 из митохондрий на месте Asp-61 состоит глутамат, также специфически атакуемый ДЦКД [1531].

Как отмечает Кагава, F_0 вряд ли представляет собой просто пору, так как зависимость скорости переноса H^+ через F_0 описы-

вается кривой с насыщением ($K_m = 10^{-7}$ М), что указывает на наличие места связывания иона H^+ [799]. Кагава и соавт. [1437] детально изучили фактор F_0 термофильной бактерии PS3. Было показано, в частности, что K_m сдвигается до $7 \cdot 10^{-7}$ М после йодирования Tyr-69 в *c*-субъединице (при йодировании снижается pK_a тирозинового гидроксила). Модификация тирозина тетранитрометаном полностью прекращает перенос протонов. Кагава [799] предположил, что Tyr-69 прямо участвует в транспорте H^+ . Кроме того, он обнаружил, что модификация Arg-36 и Arg-41 в *c*-субъединице бактерии PS3, как и блокирование Glu-56 посредством ДЦКД, выключают протонный перенос. На основе этих наблюдений, а также косвенных соображений относительно упаковки фактора F_0 в мембране была высказана гипотеза, что протон переносится по следующему маршруту: вода $\rightarrow$ Tyr-69 $\rightarrow$ Glu-56 $\rightarrow$ Arg-36 (или 41) $\rightarrow$ вода [799].

В то же время Кокс и соавт. [407], исследовавшие фактор F_0 *E. coli*, предположили, что H^+ -проводящий путь образован остатками глутамата, серина, лизина, аргинина и аспарагина в четвертой (от N-конца) α -спирали *a*-субъединицы и Asp-61 *c*-субъединицы. В четвертой α -спирали митохондриальной субъединицы 6 на тех же местах находятся соответственно глутамат, серин, глицин, аргинин и аспарагин.

Скорость переноса H^+ через фактор F_0 бактерии PS3 оказалась около $75 \text{ H}^+ \cdot \text{с}^{-1} \cdot F_0^{-1}$ при $\Delta\mu\text{H}$ порядка 95 мВ (25°). Столь медленная скорость делает крайне маловероятным предположение, что перенос H^+ идет по фиксированной цепочке водородных связей белка. По-видимому, движение H^+ требует каких-то конформационных изменений в факторе F_0 , вызывающих сближение и расхождение групп, переносящих протоны [799, 800].

Недавно Юнге и соавт. [1329] получили гораздо более высокие значения H^+ -проводимости для фактора F_0 хлоропластов, а именно $6200 \text{ H}^+/\text{с} \cdot \text{CF}_0$ при $\Delta\Psi = 100$ мВ. Однако даже эта величина, вероятно, слишком низка для H^+ -проводящего механизма типа канала.

Шиндлеру и Нельсону [1316] удалось встроить субъединицу 9 из дрожжевых митохондрий в плоскую фосфолипидную мембрану и показать возникновение протонной проводимости, чувствительной к ДЦКД. По-видимому, субъединица 9 из митохондрий (а также из хлоропластов [1386]) в отличие от ее бактериального аналога — *c*-субъединицы не требует других компонентов фактора F_0 для организации H^+ -проводящего пути. Субъединицы 9 образовывали в плоской мембране действующие независимо одиночные «каналы». Как и в опытах на природных мембранах, проводимость «канала» оказалась гораздо более низкой, чем можно было бы ожидать, если бы перенос ионов H^+ происходил по поре: через «канал» проходило всего около 100 ионов H^+ в секунду при рН

7,0 и $\Delta\Psi = 100$ мВ [1316]. Проводимость по K^+ , Na^+ и Cl^- была по крайней мере в 10^3 раз ниже, чем по H^+ [1316].

Характерной чертой митохондриального фактора F_0 является его чувствительность к олигомицину. Выделены мутанты дрожжей, у которых H^+ -проводимость через F_0 резистентна к этому антибиотику. Ответственными за резистентность оказались два локуса в субъединице 6. Оба они консервативны у человека и мыши. В то же время в *a*-субъединице *E. coli*, гомологичной митохондриальной субъединице 6, обнаружен только один из консервативных локусов [590], что согласуется с наблюдением о слабом эффекте олигомицина на H^+ —АТФ-синтазу *E. coli*. Тем не менее олигомицин препятствует связыванию $[^{14}\text{C}]$ -ДЦКД с *c*-субъединицей в факторе F_0 *E. coli*. Вентурицидин не только препятствует связыванию ДЦКД, но и тормозит перенос H^+ фактором F_0 *E. coli* [1182].

Среди прочих бактерий, исследованных на этот предмет, только *Rh. rubrum* имеет перенос H^+ , чувствительный к олигомицину. Отметим, что *Rh. rubrum* — довольно близкий сосед митохондрий на эволюционном «дереве» (см. раздел 7.4, рис. 125). Чувствительность фактора F_0 *Rh. rubrum* к олигомицину как-то связана с функцией β -субъединицы фактора F_1 . Показано, в частности, что достаточно заменить β -субъединицу в H^+ —АТФ-синтазе *Rh. rubrum* на β -субъединицу из *E. coli*, как олигомицин перестает действовать на эту систему [652].

Недавно появились сообщения об участии бактериальных *a*- и *b*-субъединиц в транспорте H^+ . Было установлено, что Glu-131 в *b*-субъединице существен для протонной проводимости, создаваемой фактором F_0 [1199]. В то же время удаление большей части *b*-субъединицы, экспонированной в воду, не тормозит перенос ионов H^+ и не препятствует связыванию ДЦКД, хотя последующая реконструкция такого F_0 с фактором F_1 дает F_0F_1 -комплекс, гидролизующий АТФ ДЦКД-нечувствительным способом [293]. Таким образом, *b*-субъединица участвует в организации правильного контакта факторов F_1 и F_0 .

Для этого контакта необходима также δ -субъединица фактора F_1 , белок, имеющий форму палочки и в основном состоящий из α -спиралей. Мутант *E. coli* с измененной δ -субъединицей не способен к генерации $\Delta\mu\text{H}$ за счет АТФ, а отделение фактора F_1 от мембраны не повышает ее проводимости для протонов. Полагают, что измененная δ -субъединица остается в мембране после отделения F_1 , закрывая вход в H^+ -проводящий путь фактора F_0 [293].

5.1.1.6. Взаимопревращение $\Delta\bar{p}H \leftrightarrow ATP$, катализируемое $H^+ - ATP$ -синтазой в протеолипосомах

Твердо установлено, что комплекс $H^+ - ATP$ -синтазы, включенный в мембрану замкнутого пузырька, представляет собой простейшую систему, способную осуществлять взаимодействие энергии АТР и $\Delta\bar{p}H$. Протеолипосомы, содержащие этот комплекс, генерируют $\Delta\bar{p}H$ за счет гидролиза АТР и синтезируют АТР за счет $\Delta\bar{p}H$, искусственно созданной на их мембране.

Кагава и Ракер [804] были первыми, кому удалось реконструировать F_0F_1 -протеолипосомы. В 1971 г. они впервые получили белково-липидные пузырьки, впоследствии названные протеолипосомами. В качестве белкового компонента был использован комплекс F_0F_1 из митохондрий бычьего сердца [804]. Протеолипосомы гидролизуют добавленный АТР, транспортировали ионы водорода из среды в свой внутренний объем и катализировали обмен $ATP \rightarrow {}^{32}P_i$. Позднее это наблюдение было подтверждено во многих лабораториях и распространено на $H^+ - ATP$ -синтазы из хлоропластов и бактерий (см. обзоры: [68, 590, 1229, 1414, 1421, 1441]). Несколько независимых методов было использовано для измерения $\Delta\bar{p}H$ и $\Delta\bar{p}H$, образуемых в F_0F_1 -протеолипосомах. В нашей группе образование $\Delta\bar{p}H$ было измерено в системе F_0F_1 -протеолипосомы — миллипорный фильтр [489, 490]. Недавно появилось сообщение, что комплекс F_0F_1 из *Streptococcus faecalis*, включенный в плоскую фосфолипидную мембрану, способен образовывать $\Delta\bar{p}H$ [26].

Факт, что энергия $\Delta\bar{p}H$ может превращаться в АТР посредством F_0F_1 , включенного в протеолипосомы, впервые был продемонстрирован все в той же, цитированной выше классической работе Кагавы и Ракера [804], наблюдавших обмен $ATP \rightarrow {}^{32}P_i$. Позднее несколько групп получили прирост АТР и убыль АДФ и фосфата при искусственной генерации $\Delta\bar{p}H$ на мембране F_0F_1 -протеолипосом (см. обзор: [490]). Особо успешными оказались опыты с $H^+ - ATP$ -синтазой хлоропластов (комплексом CF_0CF_1), когда синтез АТР поддерживался диффузионным потенциалом ионов K^+ в присутствии валиномицина [476] и искусственно созданной $\Delta\bar{p}H$ [1194, 1324]. Как было недавно показано Шмидтом и Грзбером [1324], скорость синтеза АТР в такой системе была около 200 АТР на один F_0F_1 в секунду, что всего вдвое ниже максимальной скорости фотофосфорилирования в хлоропластах.

Показано также, что в протеолипосомах, содержащих F_0F_1 и какой-либо белок — $\Delta\bar{p}H$ -генератор, АТР может быть образован независимо от того, выделен ли этот генератор из того же объекта, что и АТР-синтаза, или он имеет другое происхождение. Первый и наиболее известный опыт, демонстрирующий справедливость этого вывода, был поставлен Ракером и Стокениусом [1229]. В 1974 г. авторы опубликовали короткое сообщение о

фотофосфорилировании в протеолипосомах, составленных из компонентов всех трех царств живой природы: бактериального $\Delta\bar{p}H$ -генератора — бактериородопсина, животного потребителя $\Delta\bar{p}H$ — комплекса F_0F_1 из митохондрий сердца быка и растительных фосфолипидов — азолектина соевых бобов.

С тех пор было реконструировано много других «химер», содержащих различные $H^+ - ATP$ -синтазы и $\Delta\bar{p}H$ -генераторы (см. обзоры: [1351, 1414]).

Еще один шаг к реконструкции «химерных» преобразователей энергии был сделан, когда субхлоропластные пузырьки, лишенные части эндогенных факторов CF_1 , были реконструированы фактором F_1 из термофильных бактерий PS3. Бактериальный F_1 оказался способным блокировать утечку протонов через фактор CF_0 , потерявший CF_1 . Однако «химерный» комплекс бактериального F_1 и CF_0 был неактивен как $H^+ - ATP$ -синтаза [219].

5.1.1.7. Стехиометрия H^+/ATP

Важным нерешенным вопросом $H^+ - ATP$ -синтазного механизма остается стехиометрия H^+/ATP . Ясно лишь, что на каждую молекулу синтезируемого АТР необходимо перенести через мембрану более одного протона. Такое заключение базируется на данных по измерению $\Delta\bar{p}H$ и концентраций АТР, АДФ, фосфата. Общепринято, что при физиологических концентрациях субстратов и продукта $H^+ - ATP$ -синтазы образование АТР «стоит» порядка $45 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($10,5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) [229, 1046]. Эта величина соответствует $\Delta\bar{p}H$, равной 455 мВ при условии, что стехиометрия $H^+/ATP = 1$. Указанное значение $\Delta\bar{p}H$ примерно вдвое больше измеренного экспериментально (см., например, [393, 1183]). Таким образом, минимальное отношение H^+/ATP должно быть равно двум, предполагая, что оно выражается целым числом.

В митохондриях, фосфорилирующих внешний АДФ внешним фосфатом, $\Delta\bar{p}H$ потребляется не только $H^+ - ATP$ -синтазой, но также и ATP^{4-}/ADP^{3-} -антипортером и $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортером. В результате обмен внешних АДФ и фосфата на внутренней АТР сопровождается импортом в митохондрию одного иона H^+ . Это не означает, однако, что стехиометрия H^+/ATP митохондриального комплекса F_0F_1 может быть 1, поскольку митохондрии образуют АТР не только «на экспорт», но и для обеспечения своих собственных нужд, т. е. без участия анти- и симпортеров. Кроме того, хорошо известно, что вывернутые субмитохондриальные пузырьки и F_0F_1 -протеолипосомы способны синтезировать АТР, причем для этого не требуется никаких портеров.

Ряд фактов свидетельствует о том, что стехиометрия H^+/ATP для митохондриального комплекса F_0F_1 скорее всего равна двум, хотя величину три нельзя считать исключенной.

У растений фотофосфорилирование ADP происходит на внешней стороне мембраны тилакоидов. Полученный АТР используется преимущественно в стромах хлоропласта при синтезе глюкозы. В этом случае портеры не участвуют, а соотношение H^+/ATP обычно принимается равным трем. Тем не менее обсуждается также и величина два.

У бактерий мембранные механизмы синтеза АТР, по-видимому, могут различаться в зависимости от рН среды обитания. Ацидофилы, растущие при рН менее 5, поддерживают $\Delta\bar{p}H$ на уровне около 250 мВ, так что H^+/ATP может быть 2. У нейтрофилов (рН от 5 до 8,5) $\Delta\bar{p}H$ оказывается в области 150 мВ, так что более вероятно $H^+/ATP = 3$. При этом, однако, следует помнить, что $\Delta\bar{p}H$ вряд ли может быть измерена на целых клетках с точностью большей, чем 30%.

У алкалофилов $\Delta\bar{p}H$ снижается до очень малых значений, приближаясь к нулю при $pH \geq 11$. Это означает, что цитоплазматическая мембрана уже не может использовать обычные механизмы протонной энергетики и, по крайней мере в некоторых случаях, происходит замена $H^+ - ATR$ -синтазы на $Na^+ - ATR$ -синтазу, утилизирующую $\Delta\bar{p}Na$ вместо $\Delta\bar{p}H$ [132]. (Подробнее см. ниже гл. 7.)

Прямое измерение стехиометрии H^+/ATP возможно только в протеолипосомах или вывернутых пузырьках, полученных из мембраны органелл или бактерий. В этих случаях исключены осложнения, связанные с действием портеров или АТР-утилизирующих систем. Однако трудно избежать артефактов, связанных с утечкой протонов через фактор F_0 , лишенный фактора F_1 , а также с гидролизом АТР посредством фактора F_1 , неправильно состыкованного с F_0 , работой $H^+ - ATR$ -синтазного механизма на «холостом ходу» [1651] и т. п.

5.1.1.8. Возможные механизмы превращения энергии

Основные принципы функционирования $H^+ - ATR$ -синтазы могут быть сформулированы следующим образом.

1. ADP и фосфат, связанные с фактором F_1 , могут образовать связанный АТР без какого-либо притока энергии извне.

2. Энергия требуется для переноса связанного АТР из активного центра фактора F_1 в воду или переноса ADP и фосфата из воды в активный центр.

3. Энергия должна быть в форме $\Delta\bar{p}H$, причем $\Delta\psi$ и ΔpH эквивалентны в качестве энергетического ресурса. Они могут быть образованы естественным путем или созданы искусственно.

4. В переносе протонов через $H^+ - ATR$ -синтазный комплекс участвует фактор F_0 .

Пункт 1 базируется на работах, где был показан синтез связанного АТР изолированным фактором F_1 или дезэнергизованными

органеллами, а также на расчете энергии гидролиза АТР, связанного с фактором F_1 (см. выше раздел 5.1.1.4). Это означает, что АТР, связанный с каталитическим центром фактора F_1 , является, по существу, «низкоэнергетическим» соединением. Подобный парадокс есть следствие того обстоятельства, что энергия гидролиза связанного АТР определяется свойствами не только АТР как такового, но и его партнеров по комплексу, т. е. функциональных групп АТР-связывающего центра, локализованного на факторе F_1 .

Пункт 2 есть прямое следствие пункта 1. Если энергия не нужна для синтеза связанного АТР, то она может тратиться только на стадии освобождения синтезированного АТР или связывания ADP и фосфата.

В свою очередь, пункт 3 следует из пункта 2, если принять, что энергия для $H^+ - ATR$ -синтазной реакции поставляется в форме $\Delta\bar{p}H$.

Что касается пункта 4, то здесь можно напомнить наблюдения, свидетельствующие о способности фактора F_0 создавать в отсутствие фактора F_1 протонную проводимость в природных и реконструированных мембранах. Существенно, что олигомицин, ДЦКД и диэтилстильбэстрол, блокирующие эту проводимость, исключают трансформацию энергии $\Delta\bar{p}H \leftrightarrow ATR$ полным комплексом F_0F_1 (см. выше раздел 5.1.1.5).

Закключение, что энергия необходима для освобождения АТР, а не его синтеза как такового на факторе F_1 , было сделано Бойером еще в 1973 г. [292, 413]. Однако в то время Бойер еще не принял хемиосмотической теории Митчела и потому не рассматривал $\Delta\bar{p}H$ в качестве движущей силы процесса. В 1973—1974 гг. Митчел [1049, 1063] рассмотрел вариант устройства $H^+ - ATR$ -синтазы, в котором фактор F_1 выполнял наряду с его каталитической функцией роль $ATP/(ADP + P_i)$ -антипортера. Предполагалось, что $\Delta\bar{p}H$ служит движущей силой антипорта этих соединений между водной фазой и каталитическим центром фактора F_1 , погруженным в мембрану. Такая мысль представляется вполне естественной, поскольку существует много примеров, когда $\Delta\bar{p}H$ используется для энергозависимого транспорта веществ. Однако в дальнейшем Митчел не развил этой гипотезы, возвратившись к своей исходной схеме, где $\Delta\bar{p}H$ утилизировался для образования ангидридной связи между ADP и P_i [1050]. Такое событие гораздо труднее себе представить, чем $\Delta\bar{p}H$ -зависимый $ATP/(ADP + P_i)$ -антипорт.

В 1975—1977 гг. гипотеза транслокации субстратов получила развитие в работах нашей лаборатории [134, 1421]. Было высказано предположение, что $\Delta\bar{p}H$ -движимый антипорт $ATP/(ADP + P_i)$ происходит через так называемые некаталитические центры связывания нуклеотидов, локализованные на α -субъединице F_1 . По этой схеме ADP и фосфат сначала поступают из воды на

α -субъединицу, а затем транслоцируются на погруженную в мембрану β -субъединицу, несущую каталитический центр.

Некоторые наблюдения, сделанные в нашей группе, могут рассматриваться как свидетельство в пользу выдвинутых предположений.

1. Гидролиз АТР изолированным фактором F_1 чувствителен к водорастворимым модификаторам каталитического центра на β -субъединице, в то время как АТРазная активность субмитохондриальных частиц и интактных митохондрий не чувствительна к этим ингибиторам. В опытах использовали смешанный ангидрид АТР и мезитиленакарбоновой кислоты (АТР-МС) и водорастворимое производное карбодиимида, а именно N-циклогексил-N'- β -(4-метилморфолин)-этилкарбодиимид (ЦМКД). Такие соотношения можно объяснить предположением, что каталитический центр доступен для водной фазы в изолированном F_1 и экранирован от нее в F_1 , связанном с мембраной.

В соответствии с этим наблюдением было найдено, что $[^3H]$ -АТР-МС включается в β -субъединицу только в изолированном факторе F_1 .

2. Удаление α -субъединицы сенсibiliзирует АТРазу субмитохондриальных пузырьков к АТР-МС, указывая, что α -субъединица закрывает каталитический центр в мембранно-связанном F_1 .

3. Водорастворимые модификаторы некаталитического центра на α -субъединице, а именно ADP-МС и окисленное (диальдегидное) производное ADP (oADP), снижают АТРажную активность пузырьков, но не изолированного фактора F_1 . Это показывает, что α -субъединица как-то участвует в процессе, когда он происходит в мембранной системе.

4. В митохондриях, но не в вывернутых пузырьках АТРаза может быть сенсibiliзирована к АТР-МС и ЦМКД посредством обработки бутанолом, который, по-видимому, демаскирует каталитический центр β -субъединицы, локализованный не слишком далеко от внешней поверхности митохондриальной мембраны (см. обзор: [1422]).

Для рассматриваемой схемы существен обмен нуклеотидами между каталитическими и некаталитическими центрами фактора F_1 (см., однако, [1606]).

Другая возможность состоит в том, что нуклеотидсвязывающие места на α -субъединицах участвуют в регуляции фактора F_1 . В этом случае β -субъединица осуществляет как катализ, так и транслокацию субстратов и продуктов реакции.

Как уже отмечалось выше, А. Д. Виноградовым и соавт. [1039] было показано, что нуклеотиды оказывают мощное регулирующее воздействие на H^+ -АТР-синтазу. Оказалось, что ADP тормозит гидролиз АТР изолированным фактором F_1 двумя совершенно различными способами — конкурентно и неконкурентно по отношению к АТР. В первом случае ADP взаимо-

действовал с местом слабого связывания нуклеотидов, во втором — с местом их прочного связывания. Ингибирование в месте прочного связывания потенцировалось азидом, эффект которого снимался сульфитом. Азид, а также белковый ингибитор фактора F_1 не влияли на синтез АТР при дыхании [1558]. А. Д. Виноградов заключил, что во-первых, существуют две изоформы фактора F_1 , одна из которых приспособлена для синтеза, а другая — для гидролиза АТР, и, во-вторых, прочное связывание ADP фиксирует фермент в его «синтетической» изоформе [134, 1039, 1558]; см. также [552]). Есть и другие косвенные указания на различие путей синтеза и гидролиза АТР в H^+ -АТР-синтазе (см., например, [1542]).

Остается неясным, каким именно образом $\Delta\bar{p}H$ вызывает антипорт АТР/(ADP + P_i) между каталитическим центром и водой. Одно из предположений [134, 1422] состоит в том, что различие в числе отрицательных зарядов между полностью ионизованным АТР (четыре) и ADP + P_i (шесть) может иметь решающее значение. Приняв (рис. 77, а), что Mg^{2+} и катионные лиганды (L^+) полностью нейтрализуют ADP^{3-} и PO_4^{3-} в комплексе $[ADP^{3-} \cdot PO_4^{3-} \cdot Mg^{2+} \cdot 4L^+]$, мы приходим к ситуации, когда комплекс АТР $^{4-}$ с теми же лигандами несет два положительных заряда. Если каталитический центр фактора F_1 погружен в мембрану, т. е. находится в сфере действия $\Delta\bar{p}H$, перенос $[АТР^{4-} \cdot Mg^{2+} \cdot 4L^+]^{2+}$ из глублины мембраны в матрикс должен происходить электрофоретически. Что касается ΔpH , которая так же эффективна, как $\Delta\bar{p}H$ в качестве движущей силы, то она может превращаться в локальную $\Delta\bar{p}H$ при протонировании или депротонировании каких-то фиксированных функциональных групп (X и Y на рис. 77, а) в комплексе F_0F_1 [1422].

То, что транслокация АТР через F_1 действительно поддерживается энергией $\Delta\bar{p}H$, было показано в нашей лаборатории [377, 1422], когда изучалось торможение АТРазы субмитохондриальных пузырьков, не гидролизующихся аналогом АТР, 5-аденилилимидофосфатом (AMPPNP). Короткая предынкубация пузырьков, выдерживавшихся с AMPPNP, в среде с сукцинатом в аэробных условиях полностью снимала торможение АТРазной активности, если ее измеряли в присутствии разобщителя, добавленного после сукцината. Если же разобщитель был добавлен в среду с субмитохондриальными пузырьками до сукцината, торможение сохранялось. Именно таких соотношений можно было ожидать, если $\Delta\bar{p}H$, генерируемая при окислении сукцината, удаляет AMPPNP из каталитического центра.

В рамках рассматриваемой концепции роль фактора F_0 состоит в транслокации ионов H^+ между внешней (по отношению к митохондрии) водной фазой и областью мембраны, где располагаются фиксированные протонакцепторные группы X. Судьба этих протонов может быть двойкой. Если стехиометрия $H^+/АТР$

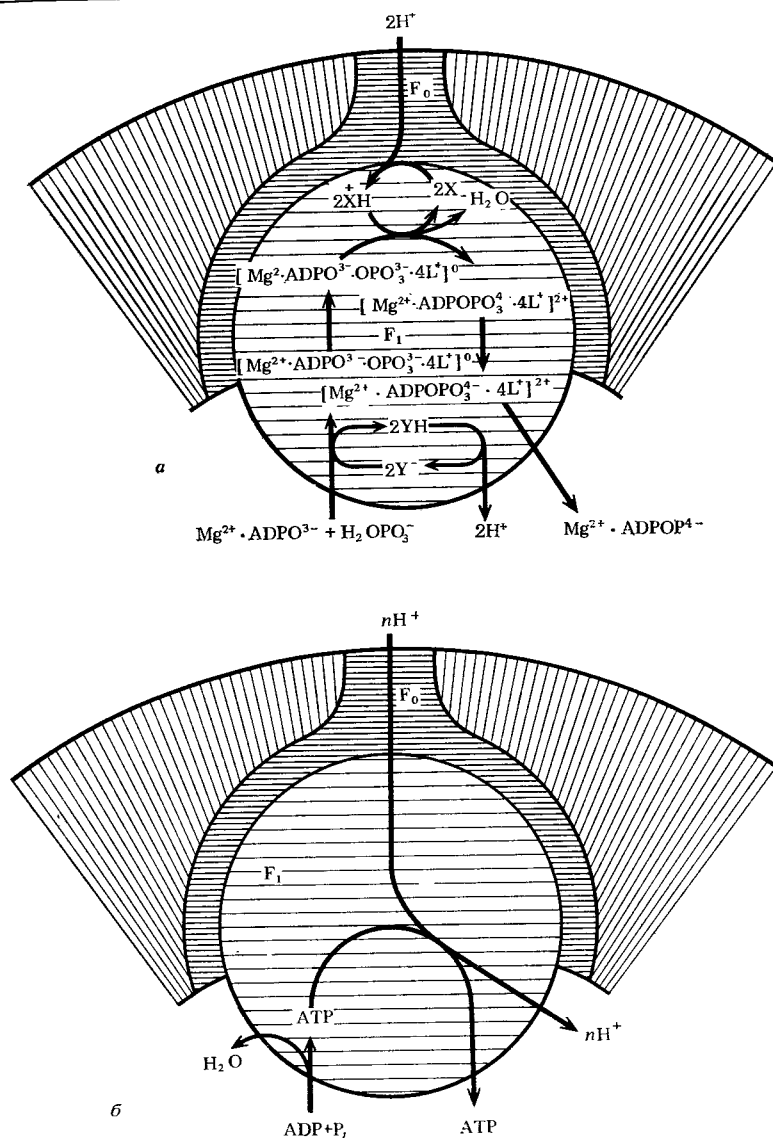
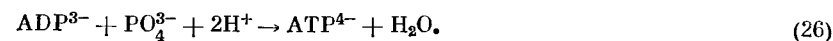


Рис. 77. Механизм действия митохондриальной H^+ —АТФ-синтазы: гипотеза транслокации субстратов

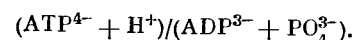
a — $2H^+$, перенесенные через F_0 в каталитический центр F_1 , потребляются при образовании АТФ (на схеме $ADPO_3^{4-}$) и H_2O из АДФ и фосфата (на схеме соответственно $ADPO^-$ и OPO_3^{3-}). Следующие два иона H^+ могут вступить в реакцию только после освобождения АТФ из каталитического центра. Они остаются на группах X вплоть до того момента, когда комплекс $[Mg^{2+} \cdot ADPO_3^{4-} \cdot 4L^+]^{2+}$ будет удален из этого центра под действием сил электри-

равна 2, то они могут поглощаться при АТФ-синтазной реакции:



Эта возможность иллюстрируется рис. 77, *a*.

Если стехиометрия равна 3, дополнительный протон должен транслоцироваться из мембраны в матрикс вместе с АТФ. В этом случае процесс в целом должен описываться антипортом



Характерная черта обсуждаемой схемы — прямое участие субстратов и продуктов реакции в утилизации или генерации $\Delta\bar{\mu}H$. Однако вполне возможен и совсем иной механизм. Допустим, например, что, во-первых, протоны, транспортируемые через фактор F_0 , не идентичны тем протонам, которые включаются в молекулу H_2O при синтезе АТФ, и, во-вторых, антипорт $ATP/(ADP + P_i)$ между матриксом и каталитическим центром фактора F_1 происходит вне электроизолирующего слоя мембраны (рис. 77, *б*). В этом случае $\Delta\bar{\mu}H$ могла бы тратиться на сопряженный с транспортом протонов перевод фактора F_1 в конформацию, облегчающую освобождение АТФ из каталитического центра. Быть может, такое изменение конформации вызывается протонированием каких-то групп в факторе F_1 (см., например, [1178]). В этом случае АТФ выбрасывается в воду не электрофорезом, а скорее за счет какой-то механической силы, развиваемой, например, вследствие кулоновских взаимодействий в H^+ —АТФ-синтазном комплексе.

Существует пример использования $\Delta\bar{\mu}H$ для совершения механической работы. Это протонные моторы, вращающие жгутики многих видов подвижных бактерий (см. ниже раздел 5.3.2). В протонном моторе трансмембранный перенос H^+ каким-то образом вызывает вращение белковой структуры — М-диска, погруженного в цитоплазматическую мембрану и сочлененного со жгутиком.

В 1981 г. мы высказали предположение, что этот принцип не ограничивается H^+ -мотором и что «вращающийся диск мог бы оказаться удобным приспособлением для совершения за счет $\Delta\bar{\mu}H$ механической работы, такой, как транслокация через мембрану крупных молекул и надмолекулярных комплексов... Вращательное движение компонента, подобного М-диску, можно в принципе сопрячь с линейным перемещением транспортируемой молекулы» [1410, с. 25]. Впоследствии эта общая идея была применена Митчелом [1056] для описания H^+ —АТФ-синтазного механизма.

Ческого отталкивания, обусловленных присутствием групп $\ddot{X}H$; *б* — ионы H^+ , участвующие в образовании H_2O (не показаны на схеме) не идентичны тем, которые симпортируются с синтезируемым АТФ при его удалении из каталитического центра

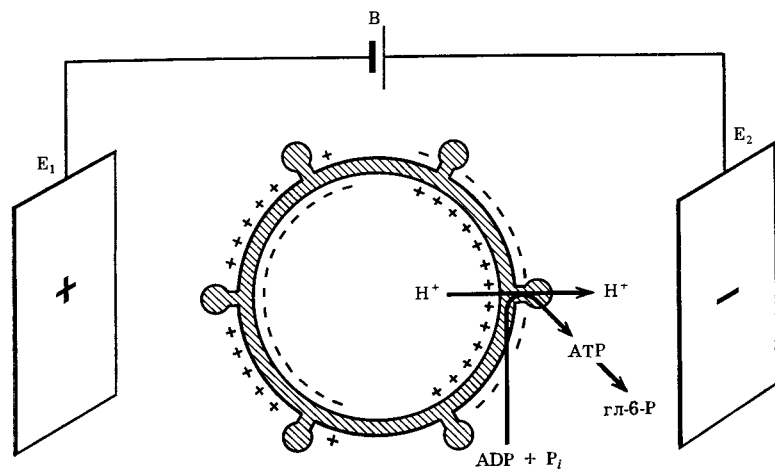


Рис. 78. Электросинтез АТР

Батарея В генерирует разность потенциалов между двумя электродами E_1 и E_2 , погруженными в раствор, содержащий F_0F_1 -протеолипосомы. Если вольтаж достаточно высок, чтобы образовать надпороговую для синтеза АТР $\Delta\psi$ на полусфере протеолипосомы, обращенной к катоду, то H^+ -АТР-синтазы, локализованные в этой полусфере, образуют АТР. Синтезированный АТР используется гексокиназной ловушкой и дает глюкозо-6-фосфат (гл-6-Р). H^+ -АТР-синтазы, локализованные в другой полусфере, несущей обратную $\Delta\psi$, в процессе не участвуют

Вращение каких-то частей фактора F_0 или F_1 в плоскости мембраны может объяснить кооперативность взаимодействия каталитических центров в факторе F_1 . Как уже отмечалось, гидролиз АТР изолированным фактором F_1 происходит очень медленно, если заполнен только один каталитический центр. Скорость реакции немедленно возрастает, когда отношение $АТР:F_1$ становится больше 1. Кроме того, описаны случаи, когда модификация хотя бы одного из трех каталитических центров фактора F_1 вызывает очень сильное торможение АТРазной активности (см., например, [1192]). Создается впечатление, что быстрое расщепление АТР в данном каталитическом центре F_1 возможно только при условии, что еще одна молекула АТР атакует один из двух других каталитических центров.

Может быть, все три каталитических центра одновременно участвуют в гидролизе трех молекул АТР, катализируя в каждый конкретный момент времени разные стадии этого процесса [1421]. Вращение факторов F_0 или F_1 может решить проблему, как соопрячь H^+ -проводящий путь фактора F_0 с тем из каталитических центров F_1 , который уже готов передать протоны фактору F_0 .

Вращение компонентов H^+ -АТР-синтазы может объяснить также парадокс, связанный с так называемым электросинтезом АТР.

Показано, что синтез АТР может быть вызван электрическим импульсом, приложенным к суспензии хлоропластов [635, 1322, 1609], бактерий [1501], субмитохондриальных пузырьков [675, 861, 1502] или F_0F_1 -протеолипосом [634, 861] (рис. 78).

Эффект был детально изучен Ноксом и Цонгом [861]. Авторы показали, что субмитохондриальные частицы, подвергнутые действию электрического поля напряженностью $30 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$ в течение 0,1 мс, синтезируют 10–12 молей АТР на моль F_1 . Синтез длился около секунды. Олигомицин и ДЦКД блокировали процесс. Пороговые значения по напряжению и по времени действия импульса оказались соответственно $10 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$ и 10 мкс. Расчет показал, что $\Delta\psi$ на мембране субмитохондриального пузырька должен быть порядка 150 мВ при напряженности поданного поля $10 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$ (см. также [1501]).

Возникает вопрос, как может одиночный импульс напряжения, длящийся всего 0,1 мс, вызвать несколько оборотов H^+ -АТР-синтазы, каждый из которых требует нескольких миллисекунд? Энергия электрического импульса не может накапливаться в делокализованной форме (например, в виде ионного градиента), поскольку направления $\Delta\psi$, образуемой в двух полусферах мембранного пузырька, оказываются противоположными. Объяснение, по нашему мнению, могло бы состоять в том, что поле напряженностью $30 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$ индуцирует образование необычно высокой $\Delta\psi$ (около 450 мВ), способной вызвать несколько оборотов ротора (скажем, фактора F_0) и, следовательно, синтез нескольких молекул АТР. (Предполагается, что вращение может продолжаться по инерции некоторое время после полного рассеяния $\Delta\psi$.)

Альтернативное объяснение требует предположения о существовании каких-то форм локальной $\Delta\mu\text{H}$.

5.1.1.9. Может ли локальная $\Delta\mu\text{H}$ участвовать в синтезе АТР?

Впервые возможная роль «локализованных» протонов в окислительном фосфорилировании была постулирована Уильямсом в 1961 г. [1601], т. е. одновременно с публикацией Митчелом его хемиосмотической гипотезы [1043]. Согласно Уильямсу, протоны, освобождающиеся при окислении донора атомов водорода, скажем CoQH_2 , акцептором электронов, например цитохромом, не выделяются в воду, а остаются внутри мембраны и прямо переносятся в каталитический центр АТР-синтазы, вызывая там синтез АТР. Схема Уильямса не требует замкнутых мембранных пузырьков. В то же время приходится постулировать наличие комплекса дыхательных ферментов и АТР-синтазы или специального механизма внутримембранного переноса протонов, сопрягающего дыхание с синтезом АТР.

Все дальнейшее развитие мембранной биоэнергетики показало, что образование АТФ H^+ —АТФ-синтазой, при дыхании и фотосинтезе требует наличия *замкнутого* пузырька, мембрана которого должна иметь очень низкую проницаемость для протонов.

В обширной биоэнергетической литературе не удается найти ни одного воспроизводимого наблюдения о синтезе АТФ, сопряженном с переносом электронов в открытых мембранных чешуйках или олигоферментных комплексах. В то же время есть множество свидетельств в пользу необходимости $\Delta\bar{p}H$, делокализованной по мембране замкнутого пузырька.

Один из наиболее ярких примеров роли делокализованной $\Delta\bar{p}H$ — опыты с ингибированием синтеза АТФ потоком ионов K^+ в присутствии очень низких концентраций грамицидина или валиномицина, когда на один пузырек приходится по одной молекуле ионофора [794, 1300].

Некоторое время тому назад была предложена компромиссная схема, предполагающая, что H^+ транспортируется поперек мембраны, но не разводится в «Тихом океане» внешней среды, а диффундирует в интерфазе или переносится вдоль мембраны особыми белками (см. обзоры: [555, 1586]).

Такая схема встречает трудности, если учесть очень высокую скорость диффузии ионов H^+ в воде. Ион H^+ , освобожденный, например, дыхательным ферментом в водную фазу, покрывает расстояние порядка 10 мкм за 2,5 мс, т. е. за время однократного срабатывания H^+ —АТФ-синтазы [1546]. Это расстояние примерно в 10^3 раз больше, чем расстояние между дыхательными и F_0F_1 -комплексам в митохондриальной мембране. Таким образом, нет нужды в специфическом механизме, ускоряющем перенос H^+ вдоль мембраны.

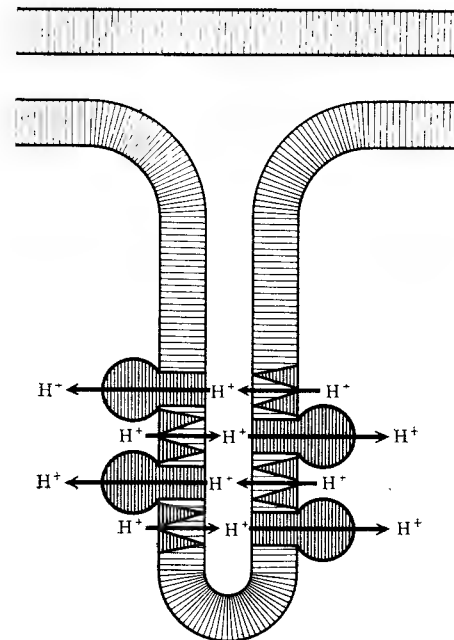
Другая трудность состоит в том, что скорости отрыва протона от последней группы протонпроводящего пути в молекуле $\Delta\bar{p}H$ -генератора и выхода этого протона в воду оказываются намного больше скорости H^+ —АТФ-синтазной реакции. Имея в виду это обстоятельство, Нахлиель и Гутман заключили, что «не должно быть различий в электрохимических потенциалах протонов в интерфазе и в объеме водной фазы» [1086].

Все сказанное свидетельствует о том, что локальная $\Delta\bar{p}H$ не в состоянии поддерживать синтез АТФ, по крайней мере без помощи делокализованной $\Delta\bar{p}H$. В то же время нельзя исключить вклада каких-то локальных эффектов в качестве *дополнительной* движущей силы или активатора H^+ —АТФ-синтазной реакции. В этой связи можно рассмотреть два типа явлений, связанных с $\Delta\bar{p}H$ - и $\Delta\psi$ -составляющими протонного потенциала.

Как мы предположили несколько лет тому назад [1413], сложный профиль сопрягающих мембран может вызывать образование небольших локальных объемов, в которых pH отличается от

Рис. 79. Иллюстрация одной из возможных причин создания локальной $\Delta\bar{p}H$ в митохондриях — сближенность $\Delta\bar{p}H$ -генераторов и H^+ —АТФ-синтаз, располагающихся на противостоящих друг другу участках внутренней мембраны, образующей гребень

Предполагается, что внутригребневое пространство, сообщаемое с межмембранным по периферии митохондрии, может иметь вид очень узкой щели, как это показано для митохондрий *in vivo*, а также для митохондрий *in vitro*, инкубируемых в среде с каким-либо высокомолекулярным соединением, например поливинилпирролидоном. В результате протоны, откачиваемые дыхательной цепью из матрикса во внутригребневое пространство, немедленно поглощаются H^+ —АТФ-синтазой, локализованной по другую сторону внутригребневой щели (по: Ван Дам и др. [1541])



такового в макроскопическом объеме среды. Например, в митохондриях H^+ ионы, откачиваемые из матрикса, попадают во внутригребневое водное пространство — очень узкую щель, образуемую складками внутренней мембраны митохондрий. Вполне возможно, что эти ионы H^+ увлекаются назад, в матрикс ближайшей H^+ —АТФ-синтазой, не успевая разбавиться внемитохондриальной средой. В результате $\Delta\bar{p}H$ между двумя сторонами H^+ —АТФ-синтазы будет больше, чем между матриксом и объемом инкубационной смеси [1415]. Согласно расчетам, проведенным Кара-Ивановым [818], такая ситуация представляется достаточно реальной. Наглядная схема, иллюстрирующая подобную возможность (рис. 79), была предложена Ван Дамом [1541].

В известной мере сходная ситуация, по-видимому, имеет место в хлоропластах. Здесь фотосистема II локализована главным образом в тилакоидах, а фотосистема I и H^+ —АТФ-синтаза — в ламеллах стромы. Коучковский и соавт. [677] обнаружили, что вклад фотосистемы II в фотофосфорилирование оказывается меньшим, чем фотосистемы I. Авторы объясняют такое различие высоким сопротивлением внутритилакоидного пространства для диффузии ионов H^+ . По существу, это пространство — тонкая щель (менее 10 нм в поперечнике), содержащая небольшое количество воды. Коучковский и соавт. [677] предположили даже, что существуют специальные белки, облегчающие движение протонов

по щели и их компартиментализацию. Однако, по данным Берцборна и соавт. [252], внутритилакоидная вода ведет себя как единый фонд ионов H^+ . В настоящий момент нет достаточных оснований, чтобы постулировать существование специального механизма транспорта H^+ вдоль мембраны тилакоидов.

У бактерий некоторые эффекты локальной ΔpH могут возникать в том случае, если внешняя мембрана способна замедлять выравнивание концентраций ионов H^+ между периплазмой и средой. Указания в этом направлении можно найти в литературе [1344].

Локальная $\Delta\psi$ наряду с ΔpH также могла бы играть известную роль в работе H^+ —АТР-синтазы. Здесь следует учитывать близкое соседство H^+ —АТР-синтазы и дыхательных (либо фотосинтетических) $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в природных сопрягающих мембранах. Как видно из рис. 74 (см. выше раздел 5.1.1.2), грибовидные выросты (факторы F_1) так близко расположены друг к другу в митохондриальной мембране, что там вряд ли можно поместить еще «грибы» между уже имеющимися. Дыхательные ферменты должны как-то уместиться между молекулами H^+ —АТР-синтазы. О плотности упаковки ферментов во внутренней мембране митохондрий говорит расчет, показывающий, что на площадь 450 нм^2 приходится в среднем один F_0F_1 -комплекс, 0,25 молекулы цитохромоксидазы, 0,125 молекулы $CoQH_2$ -цитохром c -редуктазы и 0,025 молекулы $NADH$ — CoQ -редуктазы [1426]. Допустим, что $\Delta\bar{p}H$ -генераторы случайно распределены между F_0F_1 -комплексам. Тогда окажется, что сближение тех и других на расстояние порядка нескольких нанометров должно быть не слишком редким явлением. Расстояние будет еще меньше, если допустить, что F_0F_1 и $\Delta\bar{p}H$ -генераторы могут образовывать специфические суперкомплексы. Расчеты, принимающие во внимание очень низкую диэлектрическую постоянную гидрофобной сердцевины мембраны, показывают, что локальное электрическое поле, генерируемое при переносе заряда, скажем H^+ , через мембрану, может заметно облегчить движение другого H^+ , переносимого в противоположном направлении, если траектории двух протонов располагаются на расстоянии 4 нм или ближе. Вклад такой локальной $\Delta\psi$ может быть существенным, если делокализованная $\Delta\bar{p}H$ оказывает несколько ниже пороговой величины процесс синтеза АТР.

В этой связи следует иметь в виду, что $\Delta\bar{p}H$ играет двойную роль в образовании АТР, а именно энергетическую, создавая положительный баланс изменения свободной энергии АТР-синтазной реакции, и кинетическую, ускоряя медленную стадию процесса.

Наличие выраженного порога на кривой зависимости синтеза АТР от $\Delta\bar{p}H$ связано, по всей вероятности, со второй (кинетической) функцией, так как ниже порога не происходит синтеза АТР даже в условиях, когда общий положительный баланс энергии

создается без участия $\Delta\bar{p}H$, например, при инкубации субмитохондриальных пузырьков с глюкозой, гексокиназой, $NADP^+$ и дегидрогеназой глюкозо-6-фосфата. (В присутствии такой ловушки синтез АТР энергетически выгоден даже без $\Delta\bar{p}H$.)

Если величина делокализованной $\Delta\bar{p}H$ располагается ниже кинетического порога, сумма локальной $\Delta\psi$ и делокализованной $\Delta\bar{p}H$ может превысить порог и инициировать синтез АТР.

Концепция локальной $\Delta\psi$ может объяснить данные Роттенберга [1275, 1278], обнаружившего, что добавление к митохондриям 1—10 мМ галотана ($CF_3CHClBr$) или хлороформа ($CHCl_3$) разобщает дыхание и фосфорилирование, стимулирует АТРАЗную активность не только в отсутствие, но и в присутствии разобщителя-протонофора, не снижая при этом уровня делокализованной $\Delta\bar{p}H$. Подобные эффекты можно было ожидать, допустив, что галотан и хлороформ специфически снижают локальную $\Delta\psi$. Действительно, разобщение должно происходить из-за уменьшения эффективной $\Delta\bar{p}H$. При этом делокализованная $\Delta\bar{p}H$ не уменьшается, а разобщенная АТРаза стимулируется, если она сдерживается локальной $\Delta\psi$. Снижение локальной $\Delta\psi$ может быть следствием того, что диэлектрическая постоянная галотана и хлороформа гораздо выше, чем митохондриальной мембраны.

Существенно, что рассмотренные выше концепции локальной ΔpH и локальной $\Delta\psi$ в рамках, например, схемы, показанной на рис. 79, не ревизуют основного принципа протонного цикла, поскольку протоны по-прежнему пересекают мембрану. В то же время удается обойтись без привлечения механизмов, в общем-то вряд ли реалистичных, которые запрещали бы протонам освобождаться в водную фазу после того, как они миновали гидрофобный барьер мембраны.

Заключая этот раздел, можно сделать следующие выводы:

1) делокализованная $\Delta\bar{p}H$, по крайней мере в определенных условиях, способна поддерживать синтез АТР, поскольку искусственно созданные $\Delta\psi$ и ΔpH обеспечивают образование АТР, скорость которого достигает значений, приближающихся к таковым при естественном способе подачи энергии в систему [1324];

2) нет сколько-нибудь прямых доказательств, что локальная $\Delta\bar{p}H$ в отсутствие делокализованной $\Delta\bar{p}H$ может обеспечить синтез АТР;

3) обе составляющие $\Delta\bar{p}H$, а именно $\Delta\psi$ и ΔpH , могут быть, по-видимому, частично локализованы, что достигается без каких-либо специальных механизмов просто в силу сложности конфигурации сопрягающих мембран и близкого соседства $\Delta\bar{p}H$ -генераторов и H^+ —АТР-синтаз ¹.

¹ Следует подчеркнуть, что в течение ряда лет проблеме локальной $\Delta\bar{p}H$ уделяли слишком много места в дискуссиях вокруг хемиосмотической гипотезы. Причиной тому были обстоятельства чисто психологического свой-

5.1.2. H^+ -пирофосфатсинтаза

В 1966 г. Балчевски и соавт. [216] описали образование PP_i хроматофорами *Rhodospirillum rubrum* под действием света. Позднее было найдено, что в темноте PP_i , подобно АТР, энергизует мембрану хроматофоров [215, 827, 828]. Опыты в нашей группе показали, что гидролиз PP_i генерирует $\Delta\bar{p}$ на мембране хроматофоров [758, 225], а также протеолипосом, содержащих очищенную пирофосфатазу *Rh. rubrum* [871]. Затем Шахов и соавт. [1363] продемонстрировали активный транспорт H^+ в пирофосфатные протеолипосомы, а Нирен и Балчевски [1119] сообщили о синтезе АТР за счет энергии гидролиза пирофосфата протеолипосомами, содержащими пирофосфатазу и H^+ -АТР-синтазу из *Rh. rubrum*. Протонофоры блокировали процесс. В хроматофорах был показан протонный контроль пирофосфатной активности, которая возрастала в 8 раз при рассеянии $\Delta\bar{p}H$ [1462].

Перечисленные данные представляются достаточными для заключения, что мембранная пирофосфатаза хроматофоров *Rh. rubrum* обладает активностью H^+ -насоса, катализируя обратимое взаимопревращение энергии $\Delta\bar{p}H$ и PP_i . Поэтому данный фермент может быть определен как H^+ -пирофосфат-синтаза.

Механизм действия фермента и его молекулярные свойства остаются неясными. Известен лишь набор ингибиторов, подавляющих пирофосфатную активность как мембранной, так и растворимой формы фермента: фторид, имидодифосфат, N-этилmaleимид, 4-хлор-7-нитробензо-2оксо-1,3-диазол и антибиотик дио-9. Олигомицин не влияет на фермент [1120]. ДЦКД снижает активность пирофосфатазы в хроматофорах, но не в растворе и не в протеолипосомах [1120, 1363]. Образование $\Delta\bar{p}$ протеолипосомами чувствительно к ДЦКД [871].

На первый взгляд, функцией H^+ -пирофосфатсинтазы в клетках *Rh. rubrum* должен быть синтез PP_i за счет энергии света или дыхания либо генерация $\Delta\bar{p}H$ за счет гидролиза PP_i . Однако в первом случае неясна дальнейшая судьба образованного пирофосфата, который в клетках обычного типа расщепляется растворимой пирофосфатазой, чтобы удерживать концентрацию PP_i

ства (см. ниже раздел 9.7). В это время любое наблюдение, которое сразу не удавалось объяснить хемиосмотической теорией, заносили в реестр явлений локального сопряжения. В результате возникли «микрохемиосмотическая», «полухемиосмотическая», «электродная» и другие концепции протонного цикла. Часть этих наблюдений впоследствии не подтвердилась, другие удалось согласовать с ортодоксальной («макрохемиосмотической») точкой зрения, а некоторые так и остаются непонятными, что в общем-то не удивительно, если учесть всю сложность исследуемой системы. В одном случае анализ устойчивой к протонофору (а значит, как тогда думали, «микрохемиосмотической») системы превращения энергии привел к открытию нового типа бактериальной мембранной энергетики, основанного на циркуляции Na^+ , а не H^+ (см. ниже гл. 7).

на низком уровне, необходимом для стимуляции АТР-зависимых биосинтезов, сопровождающихся образованием PP_i (см. раздел 1.4). В то же время существуют исключения из правила о том, что PP_i немедленно расщепляется до P_i растворимой пирофосфатазой. У некоторых бактерий описан целый ряд синтетических процессов, утилизирующих энергию PP_i (см. обзоры: [890, 950, 1246, 1622]). Быть может, *Rh. rubrum* относится именно к этой категории микроорганизмов. (Возможная роль PP_i как энергетического буфера *Rh. rubrum* будет рассмотрена ниже в разделе 6.3.2.) В любом случае H^+ -пирофосфатсинтаза *Rh. rubrum* должна иметь какую-то биологическую функцию. Ее активность в хроматофорах очень велика и соизмерима с таковой H^+ -АТР-синтазы.

Неожиданно высокая концентрация PP_i была обнаружена в тканях растений [519, 1429]. Как недавно сообщили Рэа и Пул [1244] и Чансон с соавт. [366], H^+ -РР-аза имеется в тонопласте и мембранах аппарата Гольджи из красной свеклы и колеоптилей кукурузы. Активность оказалась чувствительной к ДЦКД и устойчивой к ванадату. Косвенное указание на присутствие подобного фермента было получено в опытах с митохондриями [85, 982, 1362], однако на субмитохондриальных системах подтвердить это наблюдение пока не удалось.

5.1.3. H^+ -трансгидрогеназа

5.1.3.1. Общая характеристика

Обратимый перенос гидрид-иона (H^-) между NAD и NADP (уравнение 27) катализируется ферментами, называемыми трансгидрогеназами.



Такого рода ферментативная активность впервые была описана в 1952 г. Коловиком и соавт. [397]. В 1963 г. Даниэльсон и Эрнстер [425] обнаружили, что энергизация субмитохондриальных пузырьков резко сдвигает равновесие реакции (27) вправо, т. е. в сторону образования NADPH. В результате соотношение $[NADPH] \cdot [NAD^+] / [NADP^+] \cdot [NADH]$ оказывается порядка 500. В неэнергизованном состоянии это соотношение близко к 1, что вполне понятно, поскольку редокс-потенциалы пар $NADH/NAD^+$ и $NADPH/NADP^+$ различаются всего на 5 мВ.

В 1966 г. Митчел постулировал, что трансгидрогеназа представляет собой дополнительный пункт энергетического сопряжения в дыхательной цепи. Предполагалось, что окисление NADPH посредством NAD^+ (прямая реакция) генерирует $\Delta\bar{p}H$ того же направления, что и дыхание, а обратный процесс потребляет $\Delta\bar{p}H$, образуемую дыханием [1045].

В рамках этой концепции сдвиг равновесия трансгидрогеназной реакции при энергизации есть прямое следствие энергетических соотношений трансгидрогеназы и других $\Delta\bar{p}H$ -генераторов дыхательной цепи. Свободная энергия процесса превращения субстрата S в продукт P может быть рассчитана как

$$\Delta G_0' = \Delta G_0 + RT \ln ([S]/[P]), \quad (28)$$

где ΔG_0 есть изменение свободной энергии при $[S] = [P]$. Во всех $\Delta\bar{p}H$ -генераторах, за исключением трансгидрогеназы, ΔG_0 достаточно велико — порядка 7–10 ккал·моль⁻¹. И только в трансгидрогеназной реакции ΔG_0 близко к 0. Поэтому данный фермент не может составить конкуренции дыхательной цепи или АТРаза в качестве генератора $\Delta\bar{p}H$, если только произведение $[NADPH] \cdot [NAD^+]$ не окажется на несколько порядков выше, чем $[NADP^+] \cdot [NADH]$, что, конечно, вряд ли может произойти в реальных условиях.

5.1.3.2. Механизм превращения энергии

Механизм, предложенный Митчелом, предполагает, что перенос H^- от NADPH к NAD^+ должен образовывать $\Delta\bar{p}H$ того же направления, что дыхание, а перенос H^- в противоположную сторону — $\Delta\bar{p}H$ обратного знака. В обоих случаях добавление продуктов реакции должно снижать величину $\Delta\bar{p}H$. Опыты, проведенные Либерманом с сотрудниками и нашей группой подтвердили эти предположения [49, 59, 83, 479, 501, 648, 758, 1394]. Было найдено, что вывернутые субмитохондриальные пузырьки, хроматофоры *Rh. rubrum* и протеолипосомы с очищенной трансгидрогеназой генерируют $\Delta\Psi$ («плюс» внутри пузырька) при окислении NADPH посредством NAD^+ . Окисление NADH посредством $NADP^+$ также образовывало $\Delta\Psi$, но уже внутри был знак «минус». Как та, так и другая $\Delta\Psi$ исчезали при уравнивании концентраций субстратов и продуктов реакции. Генерируемые $\Delta\Psi$ оказались линейной функцией соотношения

$$\ln \frac{[NADPH] \cdot [NAD^+]}{[NADP^+] \cdot [NADH]}$$

Было сделано заключение, что трансгидрогеназная система в вывернутых субмитохондриальных пузырьках и хроматофорах катализирует следующий процесс:



Если дыхательные или фотосинтетические генераторы образуют $\Delta\bar{p}H$, благоприятную для выхода $H_{\text{внутр}}^+$, то реакция сдвигается влево.

Недавно Балчевски и соавт. [1072] продемонстрировали синтез

PP_i из P_i за счет энергии окисления NADPH посредством NAD^+ в хроматофорах *Rh. rubrum*.

Число протонов, переносимых при одном обороте трансгидрогеназы, остается неясным: экспериментально были получены величины от 0,5 до 2 [1079, 1284].

Электрогенная активность трансгидрогеназы, как показали наши опыты, чувствительна к протонофорам и ДЦКД [479]. (По сути дела эти опыты явились первым примером того, что ДЦКД тормозит не только H^+ -АТР-синтазу, но и другие $\Delta\bar{p}H$ -генераторы.)

В дальнейшем эффект ДЦКД был детально изучен Хатефи, Фишером и их коллегами [1179, 1191, 1192]. Оказалось, что NAD(H), а также ADP и AMP, связывающиеся с местом присоединения NAD(H) к трансгидрогеназе, защищают фермент от торможения ДЦКД. NADP(H), 2'-AMP и 3'-AMP не обладают таким свойством. Для выключения протонтранспортной активности трансгидрогеназы достаточно добавить 0,5 моля ДЦКД на моль фермента [1192], принимая молекулярную массу последнего равной 120 кДа [733, 1630]. Такая стехиометрия может объясняться димерной организацией трансгидрогеназы [165, 1629]. Было высказано предположение [1192], что ДЦКД атакует один из двух идентичных 120 кДа-мономеров в димере, инактивируя весь димер. Подобные соотношения были описаны для фактора F_1 , в котором модификация всего одной из трех β -субъединиц посредством ДЦКД почти полностью инактивирует АТРаза [1192].

Существенным моментом трансгидрогеназного механизма является то обстоятельство, что при этой реакции имеет место прямой стереоспецифический перенос H^- между положением А никотинамидного кольца NAD и положением В такового NADP. При этом не происходит обмена протонами с водой [914]. Следовательно, протоны, транспортируемые ферментом через мембрану, не идентичны тем протонам, которые переносятся от одного никотинамиднуклеотида к другому при трансгидрогеназной реакции.

Как NAD(H), так и NADP(H) взаимодействуют с той стороной трансгидрогеназы, которая смотрит в матрикс митохондрии (или цитоплазму бактериальной клетки). В то же время существуют необходимые для активности трансгидрогеназы функциональные группы, экспонированные в воду на противоположной стороне мембраны. Было показано, что непроницающий фотоактивный модификатор белка, заключенный в трансгидрогеназные протеолипосомы, при освещении включается в фермент, причем эффект стимулируется добавлением в среду инкубации $NADP^+$ и 3-ацетилширидиннуклеотида, тормозится посредством NADH и не изменяется NADPH. Можно заключить, что связывание субстратов меняет конформацию домена трансгидрогеназы, локализованного по другую сторону гидрофобного барьера [1180]. Как было пока-

зано в нашей лаборатории, непроникающий реагент на SH-группы ингибирует трансгидрогеназу, будучи добавленным со стороны, противоположной субстратсвязывающему домену.

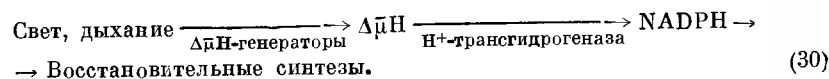
Как уже отмечалось выше, мономер митохондриальной H^+ -трансгидрогеназы представляет собой один очень длинный полипептид массой 120 кДа. В *E. coli* аналогичный фермент состоит из двух полипептидов, суммарная масса которых чуть меньше таковой мономера митохондриальной трансгидрогеназы. ДЦКД взаимодействует с большей субъединицей (50 кДа), не влияя на меньшую (47 кДа). При включении в протеолипосомы фермент из *E. coli* образует $\Delta\bar{p}H$. Процесс блокируется ДЦКД [388].

Принцип действия H^+ -трансгидрогеназы остается неясным. Известно, что $\Delta\bar{p}H$ не только смещает равновесие в сторону восстановления $NADP^+$, но и резко ускоряет этот процесс. Фактически первое описание энергозависимой трансгидрогеназы [425] было связано с действием на кинетику процесса, и лишь впоследствии был продемонстрирован термодинамический эффект, т. е. сдвиг равновесия [914]. Показано, что $\Delta\bar{p}H$ снижает K_m трансгидрогеназы для $NADP^+$ с 40 до 6,5 мМ и повышает K_m для NAD^+ с 28 до 43,5 мМ. Таким образом, $\Delta\bar{p}H$ благоприятствует восстановлению $NADP^+$ и затрудняет восстановление NAD^+ [1284].

Существует несколько весьма спекулятивных схем, пытающихся объяснить этот феномен (см. обзоры: [1283, 1284]). Ни одна из них не имеет сколько-нибудь серьезного экспериментального подтверждения.

5.1.3.3. Биологические функции

Безусловно главная функция H^+ -трансгидрогеназы состоит в поддержании высокого соотношения $[NADPH]/[NADP^+]$, что стимулирует восстановительные синтезы. Последние включают, как правило, один или несколько этапов, на которых происходит окисление $NADPH$. Фактически энергия, вырабатываемая дыхательной или фотосинтетической редокс-цепью в виде $\Delta\bar{p}H$, становится при посредничестве трансгидрогеназы дополнительной движущей силой восстановительных биосинтезов:



Так обстоит дело в митохондриях и в подавляющем большинстве бактерий, у которых отсутствует нециклическая фотоцепь.

В хлоропластах и цианобактериях проблема поддержания высокого соотношения $[NADPH]/[NADP^+]$ решается восстановлением $NADP^+$ в качестве конечного акцептора электронов редокс-цепи. Неудивительно, что H^+ -трансгидрогеназа в хлоропластах отсутствует.

Рассматривая возможные дополнительные функции H^+ -трансгидрогеназы, мы должны иметь в виду, что это — единственный генератор, способный, в принципе говоря, образовывать $\Delta\bar{p}H$ обратной полярности. Конечно, такой эффект требует весьма специфических условий, а именно избытка $NADH$ и $NADP^+$ по сравнению с NAD^+ и $NADPH$ и полного выключения всех прочих $\Delta\bar{p}H$ -генераторов. Образование обратной $\Delta\bar{p}H$ должно изменить направление всех $\Delta\bar{p}H$ -зависимых транспортных процессов (см. подробнее [126]).

В обычных условиях действие H^+ -трансгидрогеназы также может создавать определенные проблемы. Поддерживая очень высокое соотношение $[NADPH]/[NADP^+]$, она должна тем самым тормозить другие процессы восстановления $NADP^+$. Чтобы стимулировать эти процессы независимо от потребляющих $NADPH$ восстановительных синтезов, необходимо одно из двух: разобщение или замена H^+ -трансгидрогеназы $\Delta\bar{p}H$ -независимым ферментом. В связи со второй возможностью следует указать на энерго-независимую трансгидрогеназу, найденную у некоторых бактерий. По свойствам она резко отличается от H^+ -трансгидрогеназы. Это — флавопротеид, легко переходящий в раствор. Он имеет общее место для связывания $NAD(H)$ и $NADP(H)$, специфичен к положению В в никотинамидном кольце как NAD , так и $NADP$. В то же время этот фермент катализирует окисление $NADPH$ посредством NAD^+ гораздо быстрее, чем обратную реакцию, напоминая в этом отношении H^+ -трансгидрогеназу в деэнергизованных условиях. Таким образом, и энерго-независимая трансгидрогеназа, и H^+ -трансгидрогеназа при разобщении могут успешно питать дыхательную цепь восстановительными эквивалентами, поставляемыми дегидрогеназами, работающими с $NADP$.

5.1.3.4. Другие системы обратного переноса восстановительных эквивалентов

В некоторых случаях трансгидрогеназа оказывается включенной последовательно с системой обратного переноса восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи. По-видимому, эта ситуация имеет место в хроматофорах *Rh. rubrum*, окисляющих субстраты с редокс-потенциалом около нуля (серу, S^{2-} и т. д.). На свету $\Delta\bar{p}H$, образующаяся циклической фотоцепью, может использоваться, во-первых, для обращения $NADH-CoQ$ -редуктазы, т. е. для восстановления NAD^+ серой или сульфидом, и, во-вторых, для окисления образующегося $NADH$ посредством $NADP^+$ в трансгидрогеназной реакции [126].

Есть примеры, когда обратный перенос восстановительных эквивалентов оказывается одним из основных потребителей $\Delta\bar{p}H$ в клетке. Таковы бактерии, использующие субстраты с положи-

тельным редокс-потенциалом в качестве единственного источника энергии и восстановительной силы.

Как уже отмечалось выше (раздел 3.4.7.3), *Thiobacillus ferrooxidans* окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+} (редокс-потенциал 0,77 В) кислородом и строит все компоненты своей клетки из CO_2 , H_2O и NH_3 . Чтобы сделать это, необходимо не только обратить $NADH-CoQ$ -редуктазу, но и $CoQ-H_2$ -цитохром *c*-редуктазу.

Обратный перенос электронов, по-видимому, не нужен хлоропластам и имеет ограниченное значение для митохондрий. Однако в последнем случае следует учитывать определенные регуляторные эффекты, сопутствующие восстановлению NAD^+ сукцинатом, на что настойчиво указывает М. Н. Кондрашова [1972].

5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$

5.2.1. Определение и классификация

Термин «осмотическая работа» в его широком смысле относится к любому процессу трансмембранного переноса вещества в сторону большей его концентрации. Такой перенос сопровождается появлением осмотического дисбаланса между двумя объемами, разделенными мембраной, поскольку по крайней мере в одном из этих объемов меняется концентрация транспортируемого вещества.

Вообще говоря, образование градиентов ионов специфическими ионными насосами, такими, как $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы, ионтранспортные АТРАЗы и т. д., должно быть отнесено к осмотической работе. Однако такого рода эффекты принято исключать из рассмотрения в данном контексте. Вместо этого главное внимание уделяется транспорту метаболитов, движимому посредством $\Delta\bar{\mu}H$, $\Delta\bar{\mu}Na$, АТР или фосфоенолпирувата (РЕР). Ниже мы разберем $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимую осмотическую работу.

В митохондриях все энергозависимые виды транспорта веществ поддерживаются энергией $\Delta\bar{\mu}H$. В плазмалемме и тонопласте растений и грибов большинство процессов такого типа также происходит за счет $\Delta\bar{\mu}H$. В то же время в плазмалемме животной клетки гораздо более типичны $\Delta\bar{\mu}Na$ -зависимые транспортные системы, однако в некоторых особых случаях движущей силой осмотической работы служит $\Delta\bar{\mu}H$. Что касается бактерий, то здесь описаны примеры использования всех перечисленных выше движущих сил, хотя $\Delta\bar{\mu}H$ и АТР применяются наиболее часто. У морских и галофильных микроорганизмов вместо $\Delta\bar{\mu}H$ используется с той же целью $\Delta\bar{\mu}Na$. У *E. coli* среди 16 систем транспорта аминокислот 8 переносчиков утилизируют АТР, 5 переносчиков — $\Delta\bar{\mu}H$, одна — $\Delta\bar{\mu}Na$ и две системы — как $\Delta\bar{\mu}H$, так и $\Delta\bar{\mu}Na$ (табл. 13). Та же *E. coli* накапливает глюкозу за счет энергии РЕР, а лактозу — за счет $\Delta\bar{\mu}H$.

Таблица 13. Системы аккумуляции аминокислот в клетках *E. coli* (по: Апраку [167])

Аминокислота	Движущая сила транспорта	Аминокислота	Движущая сила транспорта
Ala—Gly	$\Delta\bar{\mu}H$	Lys, Arg, Orn	АТР
Thr, Ser	$\Delta\bar{\mu}H$	Arg	АТР
Leu, Ile, Val (система I)	АТР	Gln (система I)	АТР
Leu, Ile, Val (система II)	АТР	Gln (система II)	АТР
Leu, Ile, Val (система III)	$\Delta\bar{\mu}H$	Glu (система I)	$\Delta\bar{\mu}H$, $\Delta\bar{\mu}Na$
Leu, Ile, Val (система IV)	$\Delta\bar{\mu}H$	Glu (система II)	$\Delta\bar{\mu}H$, $\Delta\bar{\mu}Na$
Phe, Tyr, Trp	$\Delta\bar{\mu}H$	Цистин (система I)	АТР
PrO	$\Delta\bar{\mu}Na$	Цистин (система II)	АТР

$\Delta\bar{\mu}H$ -зависимая аккумуляция вещества S в отсеке, заряженном отрицательно (например, в матриксе митохондрии или в цитоплазме бактерии), описывается уравнением (31)

$$RT \ln \frac{[S]_{\text{внутр}}}{[S]_{\text{наруж}}} = -(n + Z) F \Delta\psi - n RT \ln \frac{[H^+]_{\text{внутр}}}{[H^+]_{\text{наруж}}}, \quad (31)$$

где n — число ионов H^+ , переносимых в симпорте с одной молекулой S, а Z — число положительных зарядов на S [879].

5.2.2. $\Delta\psi$ как движущая сила

Если транспортная система осуществляет аккумуляцию катиона сильного основания внутри заряженного положительно отсека (или откачивает анион сильной кислоты из этого отсека), единственной движущей силой процесса может быть $\Delta\psi$ -составляющая протонного потенциала. Для одновалентного катиона C^+ соотношение концентрации по ту и другую стороны мембраны описывается уравнением (32)

$$RT \ln \frac{[C^+]_{\text{внутр}}}{[C^+]_{\text{наруж}}} = -F \Delta\psi. \quad (32)$$

Легко подсчитать, что создание десятикратного градиента C^+ при температуре порядка 25° требует $\Delta\psi$ около 60 мВ.

Такое простое электрофоретическое поведение системы ионного транспорта показано, например, для переноса ионов K^+ в присутствии антибиотика валиномицина. Подобный механизм

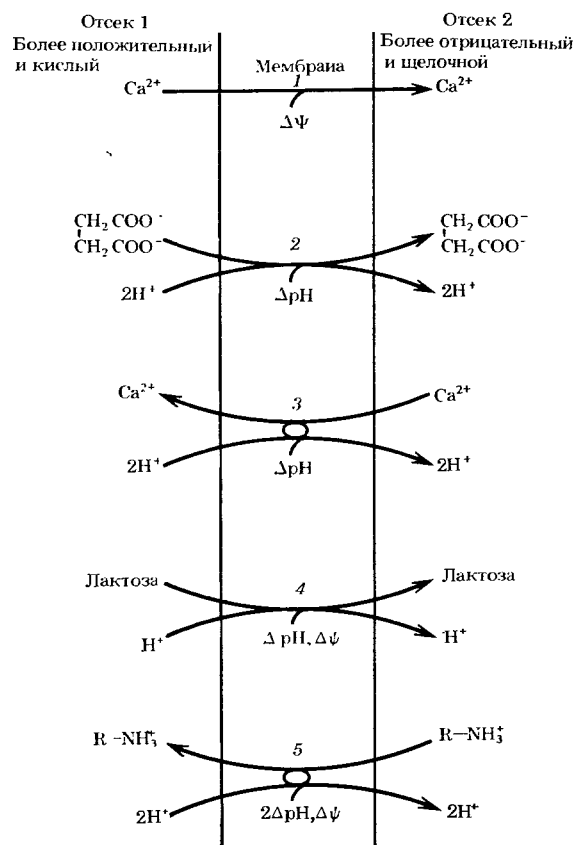


Рис. 80. Примеры $\Delta\mu\text{H}$ -зависимых транспортных систем

1 — электрофоретический унипорт катиона сильного основания (Ca^{2+}) в отрицательно заряженный отсек; 2 — $\Delta p\text{H}$ -зависимый симпорт протонов и аниона слабой кислоты (сукцината) в щелочной отсек; 3 — антипорт катиона сильного основания (Ca^{2+}) и протонов по $\Delta p\text{H}$; 4 — симпорт нейтрального соединения (лактозы) и протонов по $\Delta p\text{H}$; 5 — симпорт катиона слабого основания (R-NH_3^+) и протонов. Вклад $\Delta p\text{H}$ вдвое превышает таковой $\Delta\Psi$.

ответствен также за перенос ионов Ca^{2+} в митохондрии и бактерии (рис. 80, система 1). Однако в этом случае коэффициент Z (см. уравнение 34) равен двум, так что для создания десятикратного градиента оказывается достаточным $\Delta\Psi = 30$ мВ (см. обзор [922]).

Как валиномицин, так и митохондриальный унипортер ионов Ca^{2+} решают сравнительно простую задачу. Они узнают ион, подлежащий транспорту, и облегчают его диффузию через гидрофобный слой мембраны. Для превращения энергии $\Delta\Psi$ в ионный градиент не требуется каких-либо специальных устройств, поскольку весь процесс сводится к движению иона в электрическом поле.

Более сложные механизмы используются, по-видимому, при аккумуляции ионов K^+ клетки *E. coli*. Как было найдено Эпстайном и соавт., здесь имеются по крайней мере две системы импорта K^+ , а именно K^+ -транспортирующая система А (TrkA) [540] и K^+ -АТРаза (Kdp-система) [540, 541, 898, 1248, 1591]. TrkA действует при обычных концентрациях K^+ в среде, в то время как K^+ -АТРаза индуцируется резким снижением $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$. По Сильверу [1388] и Баккеру и Харольду [211], TrkA использует энергию $\Delta\mu\text{H}$ и аллостерически активируется АТР. Есть указание, что TrkA представляет собой K^+ , H^+ -симпортер [213]. Если действительно так, то TrkA может использовать не только $\Delta\Psi$, но и $\Delta p\text{H}$. Нет сомнений, что K^+ -АТРаза утилизирует АТР. Однако и $\Delta\Psi$ может участвовать в ее энергообеспечении, если этот фермент катализирует унипорт ионов K^+ , поскольку K^+ переносится из положительно заряженного отсека в отсек, заряженный отрицательно. В данной связи следует отметить, что необходимо объяснить, каким образом *E. coli* может создать градиент K^+ более 4 порядков, используя K^+ -АТРАЗу. Чтобы получить подобный градиент, стехиометрия K^+ : АТР должна быть не выше 1. При большей стехиометрии проблема может быть решена, если использовать сумму энергий АТР и $\Delta\Psi$. Подобный механизм, по-видимому, ответствен за 50 000-кратную аккумуляцию ионов K^+ в клетках *Methanobacterium thermoautotrophicum* при росте на малокалевой среде [1334].

У *E. coli* существует специальный механизм экспорта K^+ из клетки. Он был рассмотрен Мьюри и соавт. [1022], изучавшими осморегуляцию. Как показали опыты, *E. coli* отвечает на повышение осмолярности среды поглощением K^+ через TrkA-систему. Увеличение $\text{K}^+_{\text{внутр}}$ препятствует созданию осмотического дисбаланса между цитоплазмой и гипертонической средой. Неудивительно, что снижение осмотического давления среды ведет к выходу ионов K^+ из клетки. Однако выход этот происходит с участием уже иного механизма, отличающегося от TrkA по меньшей мере двумя свойствами: он не работает с Rb^+ и тормозится блокаторами калиевых каналов плазмалеммы эукариот. Энергетический аспект системы экспорта K^+ остается неясным.

Простой процесс электрофореза может, по-видимому, объяснить движущие силы трансмембранных потоков некоторых анионов. В тилакоидах ион Cl^- движется во внутренний отсек, заряжающийся положительно благодаря работе фотодели. В митохондриях выход аниона АТР также происходит электрофоретически. Однако здесь эта система усложняется тем, что имеет место антипорт $\text{ATP}^{4-}_{\text{внутр}}/\text{ADP}^{3-}_{\text{наруж}}$ (см. подробнее ниже раздел 5.2.7.2).

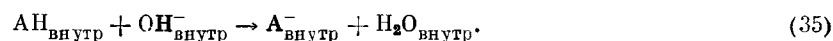
5.2.3. ΔpH как движущая сила

Электрофоретический транспорт ионов приводит к тому, что катионы и анионы аккумулируются соответственно в отрицательно и положительно заряженных отсеках. Однако очевидно, что разделение веществ на катионы и анионы вряд ли может быть той целью, ради которой живая клетка тратит энергию на осмотическую работу. Один из путей, помогающих обойти ограничение простого электрофореза, состоит в превращении $\Delta\bar{p}H$ -составляющей протонного потенциала в ΔpH . Как будет показано ниже (раздел 6.3.1), $\Delta\bar{p}H$ есть первичная форма $\Delta\bar{p}H$, поскольку электрическая емкость мембраны меньше, чем рН-буферная емкость разделенных мембраной растворов. Для превращения $\Delta\bar{p}H$ в ΔpH необходим электрофоретический поток ионов, разряжающий трансмембранную разность потенциалов.

Если $\Delta\bar{p}H = 0$, то уравнение (31) (см. предыдущий раздел) упрощается следующим образом:

$$\frac{[S]_{\text{внутр}}}{[S]_{\text{наруж}}} = n \frac{[H^+]_{\text{наруж}}}{[H^+]_{\text{внутр}}} \quad (33)$$

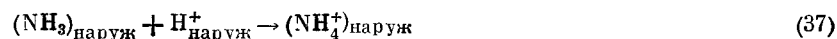
В простейшем случае слабая кислота или слабое основание аккумулируются соответственно в более щелочном или более кислом отсеке. Для аккумуляции достаточны два условия: мембрана должна быть проницаема для нейтральной формы кислоты (основания) и непроницаема для их заряженной формы. Если выполняются оба эти требования, то происходят простые события, описываемые уравнениями (34) и (35)



Потребляемые щелочные эквиваленты пополняются $\Delta\bar{p}H$ -генераторами, откачивающими ионы H^+ из, скажем, матрикса митохондрий.

Именно таким способом энергизованные митохондрии накапливают ацетат. Поскольку протонированная форма уксусной кислоты (CH_3COOH) представляет собой мелкую незаряженную молекулу, она проходит сквозь мембрану без всяких переносчиков по градиенту рН и аккумулируется в матриксе в форме непроницаемого ацетат-иона (CH_3COO^-), нейтрализуя избыток ионов OH^- .

Аналогичный механизм, действующий в противоположном направлении, вызывает выход аммиака:



Если слабое основание или слабая кислота не растворимы в жиру, требуются соответствующие переносчики, специфичные к незаряженной форме основания (кислоты). Примером такого механизма может быть митохондриальный переносчик сукцината, связывающий сукцинат $^{2-}$ ($^-OOCCH_2CH_2COO^-$) на наружной поверхности внутренней мембраны и переносящий его вместе с двумя H^+ наруж в матрикс. В целом процесс эквивалентен переносу недиссоциированной формы янтарной кислоты ($HOOCCH_2CH_2COOH$), концентрация которой в нейтральном растворе очень низка (см. рис. 80, система 2).

Итак, наличие вторичной формы протонного потенциала (ΔpH) позволяет вовлечь в процессы транспорта слабые кислоты и основания таким образом, что направления их движения оказываются противоположными.

Как и в случае электрофореза катионов и анионов, разнонаправленный перенос слабых кислот и оснований не может решить всех задач, стоящих перед транспортными системами клетки или органеллы. Например, бактерия, судя по направленности $\Delta\bar{p}H$, должна накапливать катионы и слабые кислоты, и выбрасывать в среду анионы и слабые основания. Очевидно, что во многих случаях направление движения вещества должно быть иным.

Для катионов сильных оснований проблема может быть решена путем использования катион/ H^+ -антипортеров. Например, в митохондриях [126] и некоторых бактериях [1649], кроме электрофоретической системы аккумуляции ионов Ca^{2+} , есть электронейтральный $Ca^{2+}/2H^+$ -антипортер, откачивающий Ca^{2+} из матрикса или бактериальной цитоплазмы с использованием $\Delta\bar{p}H$ (см. рис. 80, система 3). Таким образом, митохондрии и бактерии могут не только аккумулировать ионы Ca^{2+} , но и активно выбрасывать эти ионы в среду. Ясно, что две названные системы должны действовать не одновременно, а попеременно, иначе взаимодействие Ca^{2+} -унипортера и $Ca^{2+}/2H^+$ -антипортера приведет к рассеянию энергии $\Delta\bar{p}H$.

Подобным образом анионы сильных кислот могут накапливаться в матриксе за счет $\Delta\bar{p}H$, если они симпортируются с ионами H^+ . Так устроен, в частности, механизм накопления фосфата в митохондриях и бактериях. Нейтральная форма фосфорной кислоты (H_3PO_4) практически отсутствует при физиологических значениях рН. Анионы фосфата должны откачиваться из митохондрий (бактерий), двигаясь по $\Delta\bar{p}H$. Тем не менее фосфат не только не откачивается, а, напротив, накапливается митохондриями и бактериями под действием $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортера (подробнее см. раздел 5.2.7.3).

5.2.4. Общая $\Delta\bar{p}H$ как движущая сила

Иногда движущей силой транспорта оказываются обе составляющие протонного потенциала: $\Delta\psi$ и ΔpH . Это, например, имеет место при переносе веществ, не обладающих ни зарядом, ни кислотно-основными свойствами. Такие соединения могут переноситься вместе с протоном или обмениваться на протон, используя энергию общей $\Delta\bar{p}H$. Так, аккумуляция лактозы бактериями

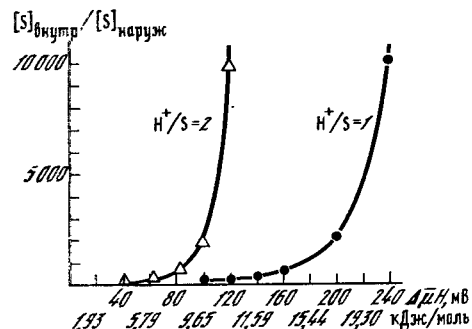


Рис. 81. Зависимость аккумуляции вещества S от $\Delta\bar{p}H$ при двух различных значениях стехиометрии H^+ : вещество (по: Котик [879])

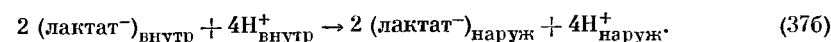
осуществляется посредством лактоза, H^+ -симпортера (см. рис. 80, система 4; подробнее см. ниже раздел 5.2.7.1). Вакуоли корнеплодов сахарной свеклы накапливают сахарозу при помощи сахароза/ H^+ -антипортера [306]. Причиной, по которой в данном случае используется антипортер, а не симпортер, является то обстоятельство, что $\Delta\bar{p}H$ на мембране вакуоли направлена в другую сторону, чем на бактериальной мембране.

$\Delta\psi$ и ΔpH одинаково эффективны в качестве движущей силы при работе лактоза, H^+ -симпортера и сахароза/ H^+ -антипортера. В подобных системах повышение стехиометрии « H^+ :вещество» сдвигает влево кривую зависимости отношения $[S]_{\text{внутр}}/[S]_{\text{наруж}}$ от $\Delta\bar{p}H$ (рис. 81). В других случаях повышение стехиометрии определяет направление транспорта. Примером тому служит аккумуляция положительно заряженных катехоламинов ($R\dot{N}H_3^+$) в хромаффинных гранулах коры надпочечников. Здесь имеется H^+ -АТРаза, накачивающая ионы H^+ в гранулы, в результате чего их внутренний объем заряжается положительно и закисляется (см. выше раздел 4.5.1). Аккумуляция $R\dot{N}H_3^+$ обусловлена $R\dot{N}H_3^+/2H^+$ антипортером (см. рис. 80, система 5). Тем самым перенос одного $R\dot{N}H_3^+$ внутрь гранул сопровождается переносом *двух* протонов и *одного* положительного заряда в противоположном направлении. Сказанное означает, что энергетически равные по величине $\Delta\psi$ и ΔpH будут вносить разный вклад в обеспечение

процесса транспорта, т. е. ΔpH окажется вдвое более эффективной, чем $\Delta\psi$ (см. выше уравнение 31). В то же время в системах типа TrkA (раздел 5.2.2), когда катион (K^+) симпортируется с H^+ , вклад $\Delta\psi$ должен быть вдвое больше, чем ΔpH , коль скоро транспорт одного иона K^+ связан с переносом *двух* зарядов и *одного* H^+ .

В силу обратимости транспортных процессов градиент метаболита, образующегося внутри клетки и выделяющегося в среду $\Delta\bar{p}H$ -зависимой транспортной системой, может, в принципе, использоваться как источник энергии для генерации $\Delta\bar{p}H$.

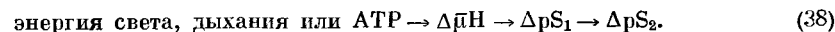
Например, в анаэробных *Streptococcus cremoris* [305, 872, 1143] и *Streptococcus faecalis* [1390] образование лактата в результате гликолиза приводит к возникновению градиента этого продукта между цитоплазмой и средой ($[лактат]_{\text{внутр}} > [лактат]_{\text{наруж}}$). Выход лактата из клетки катализируется лактат, nH^+ -симпортером, где $n = 2$ при низких значениях $[лактат]_{\text{наруж}}$ и $[H^+]_{\text{наруж}}$. Коэффициент n понижается до 1, когда уровни лактата и H^+ в среде возрастают [305, 872, 1390]. Это означает, что совместное действие гликолиза и симпортера защелачивает цитоплазму и заряжает ее отрицательно, если концентрации лактата и H^+ снаружи клетки низки:



Аккумуляция лактата и H^+ в среде модифицирует этот механизм таким образом, что количества лактата и ионов H^+ , выходящих из клетки, уравниваются и поэтому генерация $\Delta\bar{p}H$ прекращается. Подобного рода регуляция предотвращает «затоваривание» клетки молочной кислотой.

5.2.5. $\Delta\bar{p}H$ -зависимые транспортные каскады

Описано несколько систем, в которых $\Delta\bar{p}H$ используется для создания градиента определенного компонента (S_1), а этот градиент затем утилизируется для транспорта другого вещества (S_2):



Подобная цепь событий может быть и более длинной, если ΔpS_2 поддерживает транспорт метаболита S_3 и т. д.

В бактериях роль S_1 часто выполняется ионами Na^+ . В этом случае энергия $\Delta\bar{p}H$ потребляется при откачке ионов Na^+ из клетки посредством электронейтрального Na^+/H^+ -антипортера или электрогенного Na^+/H^+ -антипортера. Образованная ΔpNa используется для аккумуляции различных метаболитов при помощи Na^+ , метаболит-симпортеров. Этот вид осмотической работы

оказывается основным у галофильных и многих морских микроорганизмов (подробнее см. раздел 7.2.1.1).

В митохондриях длинный $\Delta\bar{p}H$ -зависимый каскад был описан при исследовании механизмов переноса фосфата и интермедиатов цикла Кребса. Процессом, запускающим каскад, служит образование $\Delta\bar{\Psi}$ дыхательной цепью. Затем $\Delta\bar{\Psi}$ превращается в $\Delta\bar{p}H$ посредством электрофоретического обмена $ATP^{4-}_{\text{внутр}}/ADP^{3-}_{\text{наруж}}$, а также унипорта Ca^{2+} , K^{+} и т. д.

Полученная $\Delta\bar{p}H$ используется для создания $\Delta\bar{p}R_i$ при помощи симпорта $H_2PO_4^-$ и H^{+} , направленного снаружи внутрь митохондрии. $\Delta\bar{p}R_i$ вызывает накопление малата при помощи HPO_4^{2-} /малат $^{2-}$ -антипортера (тот же переносчик транспортирует также некоторые другие дикарбоновые кислоты). Последний этап каскада — импорт митохондриями цитрата. Процесс осуществляется переносчиком, обменивающим малат $^{2-}$ на цитрат $^{3-}$ и H^{+} (рис. 82).

Вся эта сложная система открывает возможность создания целой иерархии регулирующих воздействий на метаболизм митохондрий (см. обзоры: [126, 1177]).

5.2.6. Карнитин как пример трансмембранного переносчика химической группировки

В некоторых случаях через мембрану переносится не вся молекула транспортируемого вещества, а только ее часть. Примером тому может быть транспорт остатков жирных кислот (жирных ацилов), опосредованный участием карнитина.

Исследования карнитина имеют длинную историю, поучительную для всех, кто занимается проблемой транспорта метаболитов. Карнитин (рис. 83) был открыт в 1905 г. в России В. Гулевицем и Р. Кримбергом [662]. В то время биохимические журналы пестрели сообщениями о новых веществах биологического происхождения, поэтому описание еще одного органического соединения в мышцах вряд ли было оценено по достоинству.

В 1930-е годы, когда прогресс в понимании биологических функций низкомолекулярных соединений был особенно впечатляющим, структурное подобие карнитина и холина стимулировало ряд исследований, однако никакой метаболической функции карнитина обнаружить не удалось.

В 1940-х годах весьма популярными были работы по поиску новых витаминов, и здесь наконец-то был достигнут первый успех в изучении роли карнитина. Оказалось, что он служит одним из ростовых факторов для мучного червя *Tenebrio molitor*. Картер и соавт. [347], обнаружившие этот эффект, назвали карнитин витамином B_T (Т от *Tenebrio*). Позднее было найдено, что в условиях дефицита по карнитину и голодания черви умирают «жирными», будучи не способными утилизировать свои жировые запасы [580].

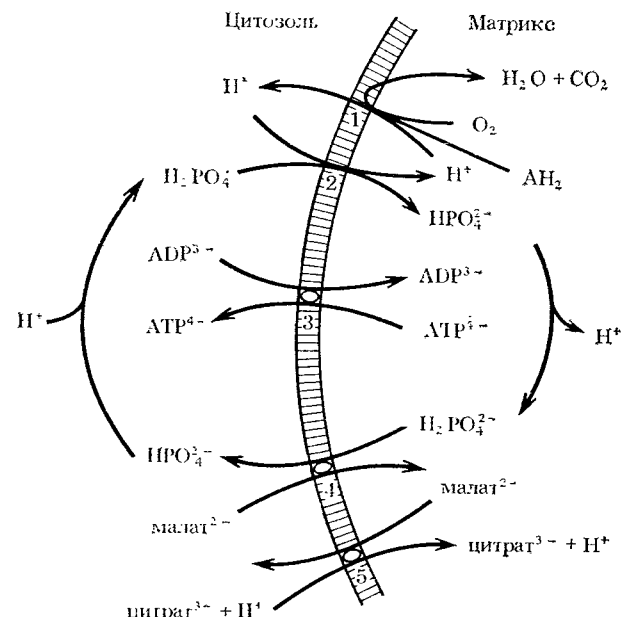


Рис. 82. Транспортный каскад внутренней митохондриальной мембраны

Дыхательная цепь (1) откачивает ионы H^{+} из матрикса. $H_2PO_4^{-}$, H^{+} -симпортер (2) и ADP^{3-}/ATP^{4-} -антипортер (3) импортируют фосфат и ADP в матрикс в обмен на АТФ. $HPO_4^{2-}/\text{малат}^{2-}$ -антипортер (4) катализирует вход малата. Малат $^{2-}$ /(цитрат $^{3-}$ + H^{+})-антипортер (5) вызывает накопление в матриксе цитрата (по: Педерсен и Верле [1177])

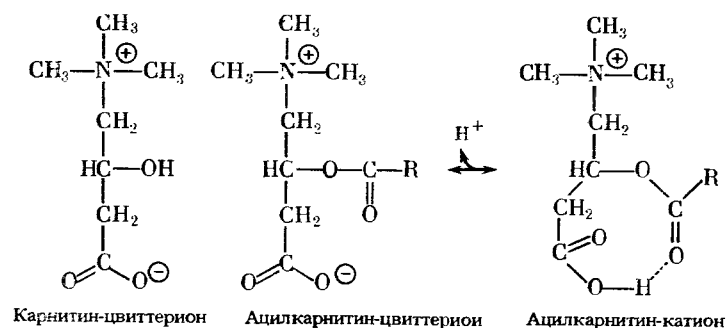


Рис. 83. Карнитин и ацилкарнитины в депротонированной (цвиттерионной) и протонированной (катионной) формах

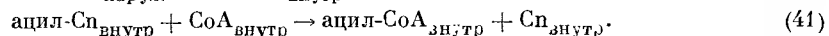
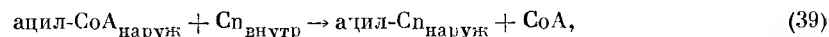
R — углеводородный остаток жирной кислоты

К несчастью для исследователей карнитина все попытки показать витаминную функцию этого вещества на объектах иных, чем мучной червь, дали отрицательный результат. Работа Картера и его коллег оказалась не в состоянии стимулировать интерес к функции карнитина просто потому, что человечество никак не заинтересовано в процветании мучных червей и, стало быть, не слишком озабочено витаминностью их пищи. К середине века, когда подавляющее большинство низкомолекулярных компонентов клетки уже нашло свое место на метаболической карте, функция карнитина все еще оставалась совершенно неясной.

В 1955 г., т. е. ровно полвека спустя после открытия карнитина, Фридман и Френкель [585] выяснили, что карнитин обратимо ацетируется посредством ацетил-СоА. Последний занимает ключевое место в метаболизме, так что можно было надеяться, что ацетилкарнитин служит интермедиатом переноса ацильных остатков с ацетил-СоА на какой-либо акцептор. Ничего подобного, однако, показано не было. Единственной реакцией утилизации ацетилкарнитина осталось его превращение обратно в карнитин с ацетилированием свободного СоА. То же верно и для ацилкарнитина, второго представителя соединений этого типа, в котором вместо ацетила имеется ацильный остаток жирной кислоты. Складывалось впечатление, что ацилирование карнитина представляет собой метаболический тупик.

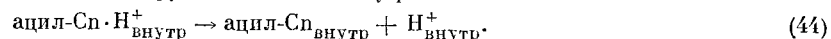
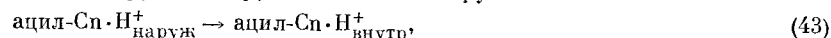
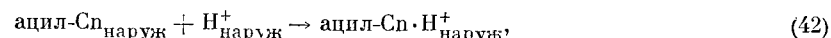
В том же 1955 г. Фритц [587] отметил стимулирующее действие карнитина на окисление жирных кислот гомогенатом печени. Подобный эффект представлялся довольно неожиданным для вещества, стоящего в стороне от главных путей метаболизма, так что наблюдение Фритца в течение некоторого времени оставалось необъясненным.

В 1960-е годы, когда начались обширные работы по мембранам, эффект Фритца также попал в поле зрения. Обнаружилось, что он как-то связан с митохондриями. Фритц [588] выдвинул гипотезу об участии карнитина в транспорте жирных кислот через митохондриальную мембрану. Эта мысль получила подкрепление, когда выяснились следующие два факта. Во-первых, карнитин-ацилтрансфераза, катализирующая перенос ацильной группы между СоА и карнитином, локализована на обеих сторонах внутренней мембраны митохондрий. Во-вторых, ацилкарнитин (но не ацил-СоА) способен проникать через митохондриальные мембраны (см. обзор [301]). На основе названных наблюдений была сформулирована схема участия карнитина (Сп) как переносчика жирных ацилов, суммированная уравнениями (39)–(41):



Два вопроса остались неясными в рамках данной концепции. 1. Какова судьба $\text{Сп}_{\text{внутр}}$? Сам по себе он не может выйти из митохондрий, так как внутренняя мембрана, как было показано, непроницаема для карнитина [301, 928]. 2. Неясно, почему именно гидрофильная молекула карнитина была отобрана эволюцией в качестве переносчика жирных ацилов.

Обе проблемы были решены в 1970-е годы. Для биоэнергетики этот период ознаменовался борьбой вокруг хемиосмотической гипотезы Питера Митчела, завершившейся его триумфом. В частности, было найдено, что любой процесс аккумуляции ионов или метаболитов в митохондриях поддерживается энергией $\Delta\mu\text{H}$. Вот почему в 1970 г. мы предположили, что роль карнитина как-то связана с использованием протонного потенциала [117]. Дело в том, что жирные кислоты представляют собой гидрофобные анионы и потому они могли бы откачиваться из митохондрий под действием $\Delta\mu\text{H}$. Протонированные формы жирных кислот могут входить обратно в митохондрии, двигаясь по $\Delta\mu\text{H}$. Циркуляция жирных кислот в мембране митохондрий должна приводить к рассеянию $\Delta\mu\text{H}$ (разобщению). В то же время ни карнитин, ни ацилкарнитин не могут быть анионами. В депротонированной форме они цвиттерионы (суммарный заряд равен нулю), а в протонированной — катионы. При этом цвиттерионные формы более гидрофильны. Сказанное позволяет предположить, что жирные кислоты, соединяясь с карнитином, утрачивают свою разобщающую активность и приобретают способность накапливаться внутри митохондрий, где происходит их β -окисление. Транспорт в целом может быть описан симпортом жирных ацилов и ионов H^+ в митохондриальный матрикс под действием общей $\Delta\mu\text{H}$:



В соответствии с предсказанием этой схемы Д. О. Левицкий в нашей группе обнаружил [80, 928, 929], что плоская искусственная фосфолипидная мембрана проницаема для катиона пальмитоилкарнитина. Как показали дальнейшие опыты, рассеяние $\Delta\mu\text{H}$ в митохондриях разобщителем резко тормозит окисление пальмитоилкарнитина, добавленного после разобщителя. В то же время разобщитель стимулирует окисление, будучи добавленным через 3 мин после пальмитоилкарнитина. По-видимому, количество пальмитоилкарнитина, накопленного энергизованными митохондриями за 3 мин инкубации, было достаточно для активного дыхания в течение всего периода полярографического опыта.

Итак, мы смогли ответить на вопрос, почему карнитин был выбран в качестве переносчика жирных ацилов. Теперь, уже зная функцию карнитина, мы можем лишь поражаться целесооб-

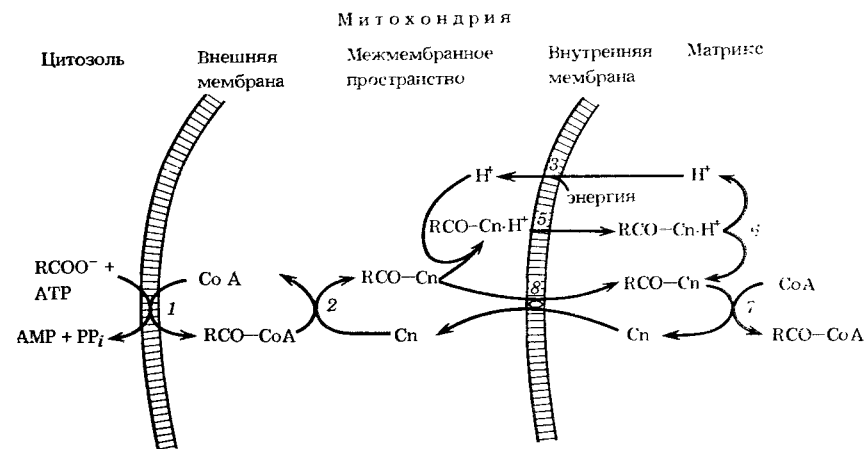


Рис. 84. Карнитинзависимый транспорт ацилов жирных кислот в матрикс митохондрий

1 — ацил-СоА-синтаза, 2 — внешняя карнитинацилтрансфераза, 3 — $\Delta\bar{p}H$ -генераторы дыхательной цепи, 4 — протонирование карбоксильной группы ацилкарнитина, 5 — $\Delta\bar{p}H$ -зависимый вход ацилкарнитина, 6 — депротонирование карбоксильной группы ацилкарнитина, 7 — внутренняя ацилкарнитинтрансфераза, 8 — карнитин / ацилкарнитин-антипортер

разности устройства этой небольшой молекулы. Все три функциональные группы карнитина необходимы для выполнения им его роли: гидроксил нужен для связи с жирным ацилом, карбоксил — для обратимого связывания протона, а четвертичный азот — для сообщения молекуле переносчика положительного заряда.

Представленная концепция оставляет без ответа лишь один, последний вопрос, а именно: что происходит с карнитином, освободившимся внутри митохондрии в реакции (41)? Эта проблема была решена в 1976 г. Панде и Парвином [1162, 1163] и Рамсеем и Таббсом [1240], обнаружившими стехиометричный карнитин/ацилкарнитин-антипорт между инкубационной смесью и митохондрией.

Общая схема транспорта немитохондриальных жирных ацилов в матрикс дана на рис. 84. Процесс начинается во внешней митохондриальной мембране, где локализована ацил-СоА-синтаза, фермент, эстерифицирующий СоА свободными жирными кислотами за счет энергии АТФ (реакция 1). В межмембранном пространстве или на внешней поверхности внутренней мембраны ацил-СоА атакуется внешней карнитинацилтрансферазой, в результате чего жирный ацил переносится с СоА на карнитин (реакция 2). Получающийся ацилкарнитин протонируется ионами $H^+_{\text{наруж}}$. Фонд $H^+_{\text{наруж}}$ пополняется дыхательными $\Delta\bar{p}H$ -генераторами, откачивающими протоны из матрикса в межмембранное пространство

(реакции 3 и 4). Протонированный ацилкарнитин пересекает внутреннюю мембрану, двигаясь под действием общей $\Delta\bar{p}H$ (реакция 5), и депротонируется в матриксе (реакция 6). Там ацилкарнитин ацилирует внутримитохондриальный СоА под действием внутренней ацилкарнитинтрансферазы (реакция 7). Освобождающийся при этом карнитин обменивается с внешним ацилкарнитином посредством карнитин/ацилкарнитин-антипортера (реакция 8).

Интересной чертой этой системы является то обстоятельство, что уровень карнитина в матриксе регулирует распределение потока ацилкарнитина в митохондрию между $\Delta\bar{p}H$ -зависимым (т. е. связанным с энергетическими затратами) путем 5 и энерго-независимым антипортом 8. Вероятно, $\Delta\bar{p}H$ -зависимый путь преобладает в тот момент, когда жирные кислоты начинают окисляться, сменяя какие-то другие субстраты дыхания. В этих условиях концентрация свободного карнитина в матриксе еще слишком мала, чтобы насытить антипортер, имеющий довольно низкое сродство к карниту (K_m около 1 мМ [301]). На данной стадии затрата $\Delta\bar{p}H$ оправдана, поскольку это форсирует накопление жирных кислот в митохондриях и тем самым способствует переходу митохондрий на окисление жирных кислот. Массированное поступление ацилкарнитина в матрикс с последующей утилизацией жирных ацилов в системе β -окисления приводит к накоплению карнитина в матриксе митохондрий в количествах, достаточных для активации антипортера. Теперь уже можно ограничить затраты $\Delta\bar{p}H$ на транспорт жирных ацилов, так как работа антипортера сама по себе не требует протонного потенциала. Следует отметить, однако, что в энергизованных митохондриях вряд ли можно когда-либо полностью избежать участия $\Delta\bar{p}H$ -зависимого пути, поскольку способность проходить сквозь липидные мембраны есть физическое свойство катиона ацилкарнитина. Такой процесс должен иметь место в любой мембране, если хотя бы часть ее площади образована липидным бислоем.

Приведенную выше логику нельзя применить к ацетилкарниту, который слишком гидрофилен для проникающего катиона. В нашей группе [126] было постулировано, что главная функция ацетилкарнитина состоит в забуферивании уровня ацетил-СоА, подобно тому как креатинфосфат забуферивает уровень АТФ.

5.2.7. Некоторые примеры $\Delta\bar{p}H$ -зависимых белков-переносчиков

В принципе говоря, образование концентрационных градиентов того или иного вещества за счет энергии $\Delta\bar{p}H$ может происходить и без какого-либо специального энергопреобразующего устройства. Как уже упоминалось выше, ацетат должен накапливаться в митохондриях, а аммиак — откачиваться во немитохондри-

альное пространство под действием ΔpH без всяких переносчиков просто потому, что мембрана проницаема для CH_3COOH и NH_3 . В такой ситуации включение переносчика может лишь ускорить процесс транспорта. В то же время переносчик оказывается совершенно необходимым, если транспортируемое вещество или химическая группировка сами по себе не могут двигаться через мембрану в нужном направлении. Живая клетка всегда стремится избежать спонтанных событий, предпочитая иметь дело с процессами, катализируемыми белками. В этом случае может быть получена высокая специфичность в отношении субстрата и регулируемая в широких пределах скорость реакции. Данный принцип применим и к $\Delta\bar{p}H$ -зависимой осмотической работе.

Огромное большинство транспортных механизмов обслуживается специальными переносчиками. В некоторых довольно редких случаях переносчик может быть достаточно просто устроен, как, например, карнитин. Грамицидин, образующий канал, проницаемый для K^+ , Na^+ и H^+ , калиевый унипортер валиномицин, K^+/H^+ -антипортер нигерицин, Na^+/H^+ -антипортер моенсин (структуры см.: [106]) также выглядят сравнительно простыми веществами рядом с белковыми молекулами. Однако следует помнить, что и карнитин, и антибиотики-ионофоры выполняют достаточно примитивные функции. В случае карнитина — это включение процесса транспорта, который затем, набрав необходимый темп, переходит на другие рельсы, где уже требуется белок-переносчик (карнитин/ацилкарнитин-антипортер). Что касается антибиотиков, то их роль, по всей видимости, сводится к повреждению мембраны клеток конкурирующих видов. Если функция переносчика более сложна, то это всегда белок.

Белки-переносчики — это трансмембранные полипептиды, которым при их работе иногда ассистируют периферические или водорастворимые белки. Давайте вернемся в этой связи к хорошо изученной системе транспорта аминокислот в *E. coli* (см. раздел 5.2.1, табл. 13). Показано, что транспортные белки 1, 2, 5, 7, 8 и 14 действуют без водорастворимых белков-помощников. Другие системы, перечисленные в той же таблице, используют растворимые белки. В случаях 3, 4 и 6 такие белки играют роль буферов, стабилизирующих уровень аминокислот в периплазме. Они обратимо связывают аминокислоты, поступающие из внешней среды, и освобождают аминокислоты, когда концентрация последних в периплазме падает из-за активности белков-переносчиков, локализованных в цитоплазматической мембране. Благодаря всем этим эффектам стабилизируется скорость импорта аминокислот в цитоплазму. Иная ситуация описана для систем 9 и 10. Здесь белки-помощники необходимы для транспорта как такового. Связав аминокислоту в периплазме, белок-помощник образует комплекс с одним из интегральных белков цитоплазматической мембраны, который играет роль «апопереносчика». Белок-помощ-

ник в системах 9 и 10 обуславливает специфическое сродство «холопереносчика» к транспортируемому веществу [167]. Ниже мы рассмотрим некоторые из $\Delta\bar{p}H$ -зависимых транспортных систем, изученных достаточно детально.

5.2.7.1. Лактоза, H^+ -симпортер из *E. coli*

По мнению Кабака [795], лактоза, H^+ -симпортер, полученный из *E. coli*, — наиболее изученный переносчик бактериального происхождения. Он был открыт в 1955 г. Коэном и Рикенбергом [392]. Спустя 8 лет, Митчел [1044] предположил, что лактоза симпортируется с протоном под действием $\Delta\bar{p}H$. В 1970 г. Уэст показал, что поглощение лактозы клетками *E. coli* сопровождается поглощением ионов H^+ [1582]. В то же время было выяснено, что продуктом гена *lac* у является какой-то мембранный белок [835]. В 1978 г. Титер и др. [1498] клонировали ген *lac* у, что позволило выяснить аминокислотную последовательность симпортера [325], амплифицировать ген [1497] и синтезировать белок *in vitro* [523]. В 1980 г. симпортер, растворенный октилглюкозидом, был встроен в протеолипосомы [1102]. (Подробности истории изучения лактозного переносчика см.: [795].)

В опытах с интактными бактериями, вывернутыми суббактериальными пузырьками и протеолипосомами, было продемонстрировано, что диффузия лактата в сторону низкой его концентрации приводит к появлению $\Delta\bar{p}H$. При этом положительно заряжался и закислялся тот отсек, где концентрация лактозы была ниже. Образованная $\Delta\bar{p}H$ тормозила перенос лактозы. Разобщители-протонофоры снимали торможение.

В то же время транспорт лактозы в сторону большей концентрации за счет энергии $\Delta\bar{p}H$, образуемой дыханием, тормозился разобщителями. Первоначально этот эффект был показан на интактных клетках *E. coli*, а затем протеолипосомах, содержащих симпортер и цитохром *o* из *E. coli* [795].

Описан мутант, сохраняющий способность только к пассивному транспорту лактозы в сторону меньшей ее концентрации. Перенос лактозы через мембрану мутанта не был сопряжен с транспортом протонов (см. обзоры: [795, 1627]).

Лактоза, H^+ -симпортер — очень гидрофобный белок массой 46,5 кДа, составленный из 417 аминокислотных остатков (рпс. 85). В мембране существует, по-видимому, в мономерной форме. Измерение кругового дихроизма указывает на высокое (85%) содержание α -спиралей, которое сохраняется после перевода белка в раствор октилглюкозидом [574, 795]. В аминокислотной последовательности удается выявить 12—14 гидрофобных сегментов протяженностью в среднем по 24 аминокислотных остатков каждый. Предполагается, что все они образуют трансмембранные α -спиральные колонны. Если это действительно так, то колонны

NH_3 -Met-Tyr-Tyr-Leu-Lys-Asn-Thr-Asn-Phe-Trp-Met-Phe-Gly-Leu-Phe-Phe-Tyr-Phe-Phe-Ile-Met-Gly-
 Ala-Tyr-Phe-Pro-Phe-Phe-Pro-Ile-Trp-Ileu-His-Asn-Ile-Asn-His-Ile-Ser-Lys-Ser-Asn-Thr-Gly-Ile-Ile-
 phe-Ala-Ala-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Leu-Leu-Phe-Phe-Gln-Pro-Phe-Phe-Gly-Leu-Leu-Lys-Leu-Gly-Leu-
 Arg-Lys-Tyr-Leu-Leu-Trp-Ile-Ile-Thr-Met-Leu-Val-Met-Phe-Ala-Phe-Phe-Ile-Phe-Gly-Pro-
 Leu-Leu-Gln-Tyr-Asn-Ile-Leu-Val-Gly-Ser-Ile-Val-Gly-Ile-Tyr-Ile-Gly-Phe-Asn-Ala-Gly-
 Ala-Pro-Ile-Val-Glu-Ala-Phe-Ile-Glu-Lys-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Asn-Phe-Glu-Phe-Glu-Arg-Ala-Arg-Met-
 Phe-Gly-Cys-Val-Gly-Trp-Ala-Leu-Cys-Ala-Ser-Ile-Val-Gly-Ile-Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Val-
 Phe-Trp-Leu-Gly-Ser-Gly-Cys-Ala-Leu-Ile-Leu-Ala-Val-Leu-Leu-Phe-Phe-Ala-Lys-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-
 Ser-Ala-Thr-Val-Ala-Asn-Ala-Val-Gly-Ala-Asn-His-Ser-Leu-Lys-Leu-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-
 Arg-Gln-Pro-Lys-Leu-Trp-Phe-Leu-Ser-Leu-Tyr-Val-Ile-Glu-Val-Cys-Thr-Tyr-Asp-Val-Phe-Asp-Gln-Gln-
 Phe-Ala-Asn-Phe-Thr-Ser-Phe-Phe-Ala-Thr-Gly-Glu-Gln-Gly-Thr-Arg-Val-Phe-Gly-Tyr-Val-Thr-Thr-
 Met-Gly-Glu-Leu-Leu-Asn-Ala-Ser-Ile-Met-Phe-Phe-Ala-Pro-Leu-Ile-Ile-Asn-Arg-Ile-Gly-Gly-Lys-Asn-
 Ala-Leu-Leu-Leu-Ala-Gly-Thr-Ile-Met-Ser-Val-Arg-Ile-Ile-Gly-Ser-Ser-Phe-Ala-Thr-Ser-Ala-Leu-Glu-
 Val-Val-Ile-Leu-Lys-Thr-Leu-His-Met-Phe-Glu-Val-Pro-Phe-Leu-Leu-Val-Gly-Cys-Phe-Lys-Tyr-Ile-Thr-
 Ser-Gln-Phe-Glu-Val-Arg-Phe-Ser-Ala-Thr-Ile-Tyr-Leu-Val-Cys-Phe-Phe-Lys-Gln-Leu-Ala-Met-
 Ile-Phe-Met-Ser-Val-Leu-Ala-Gly-Asn-Met-Tyr-Glu-Ser-Ile-Gly-Phe-Gln-Gly-Ala-Tyr-Leu-Val-Leu-Gly-
 Leu-Val-Ala-Leu-Gly-Phe-Thr-Leu-Ile-Ser-Val-Phe-Thr-Leu-Ser-Gly-Pro-Gly-Pro-Leu-Ser-Leu-
 Leu-Arg-Arg-Gln-Val-Asn-Glu-Val-Ala^{CO}

5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\mu\text{H}$

265

составляют 70% белка. Число колонн должно быть четным, так как оба конца полипептидной цепи находятся на одной и той же (цитоплазматической) стороне мембраны *E. coli*.

Место связывания лактозы локализовано в области 5—6-й колонн, считая от С-конца белковой молекулы. В этой области находится 148-й цистеин, алкилирование которого инактивирует симпортер. Лактоза защищает цистеин от алкилирования, что указывает на его участие в связывании субстрата [253, 1341].

Рис. 86. иллюстрирует вероятный механизм работы лактоза, H^+ -симпортера. Для простоты на схеме показано, что стадия 6 электрогенна, а стадия 3 неэлектрогенна. Экспериментальные данные свидетельствуют, однако, что стадия 3 также вносит небольшой, но измеримый вклад (около 15%) в генерацию $\Delta\psi$ при движении лактозы в сторону низкой концентрации [1626]. Соответственно не только стадия 6, но и 3 оказывается электрофоретической при переносе лактозы в противоположном направлении. По-видимому, трансмембранное перемещение домена, связавшего лактозу и H^+ , сопровождается смещением каких-то заряженных аминокислотных остатков полипептидной цепи на некоторое расстояние перпендикулярно плоскости мембраны.

Найдено также, что энергия $\Delta\mu\text{H}$ тратится на стадиях 1 и 5, т. е. не там, где используется $\Delta\psi$ [795, 1342, 1626—1628].

Механизм транслокации лактозы и H^+ внутри мембраны остается неизвестным. Может быть, это перенос сахара и протона по эстафете, от одного места связывания к другому. Альтернативная возможность предполагает существование только одного места связывания, локализованного в мобильном домене, движущемся сквозь гидрофобную сердцевину мембраны.

Так или иначе, устройство симпортера таково, что он может использовать энергию $\Delta\mu\text{H}$ для накопления в клетке лактозы, молекула которой лишена каких-либо заряженных или протолитических групп. Кроме того, $\Delta\mu\text{H}$ может регулировать активность этой системы. Как показали Конингс и Робилард [873], $\Delta\mu\text{H}$ влияет на степень восстановленности какого-то компонен-

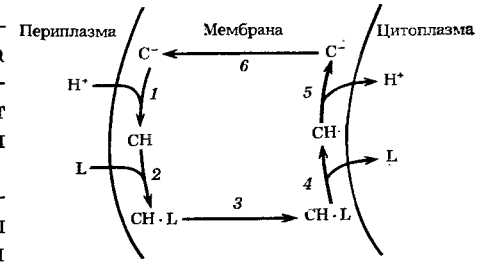


Рис. 86. Механизм действия лактоза, H^+ -симпортера

CH и C- — протонированная и депротонированная формы симпортера; L — лактоза (по: Кабак [795])

Рис. 85. Аминокислотная последовательность лактоза, H^+ -симпортера из *E. coli* (по: Бюхель и соавт. [325])

Два типа весьма специфичных ангибиторов с очень высоким средством тормозят АТФ/АДФ-антипортер. К первому типу относятся глюкозиды антрактилат и карбоксиантрактилат, представляющие собой дитерпеновые производные глюкозодисульфата. Второй тип включает бонгкрековую кислоту и ее изомер. Эти последние имеют структуру длинноцепочечной жирной кислоты с тремя карбоксильными группами.

Антрактилозид плохо проходит сквозь мембрану. При добавлении к митохондриям он атакует ту сторону антипортера, которая обращена в межмембранное пространство. Напротив, место связывания бонгкрековой кислоты обращено в матрикс, так что ингибитору приходится сначала пересечь мембрану митохондрии, чтобы связаться с антипортером. Достаточно быстро это происходит лишь при смещении рН в кислую сторону, когда становится заметным количество протонированной формы бонгкрековой кислоты. Именно эта форма может проникать через мембрану.

В вывернутых субмитохондриальных пузырьках бонгкрековая кислота эффективна и при щелочных рН, в то время как антрактилозид действует, только если он заключен внутри пузырьков. Эти данные указывают на постоянную анизотропию белка, приводящую к асимметричному действию ингибиторов [1553]. Подобная анизотропия была выявлена и при исследовании антипортера в протеолипосомах [296].

Есть целый ряд свидетельств тому, что как АТФ и АДФ, так и антрактилозид и бонгкрековая кислота вызывают значительные конформационные изменения в антипортере (см. обзор: [1553]).

Принцип работы АТФ/АДФ-антипортера остается неясным. Возможные варианты рассмотрены в обзорах Пьера Винье и соавт. [1553, 1554] и Клингенберга [855]. Один из них будет разобран ниже в разделе 5.4.2. Что касается биологической функции этой системы, то она очевидна. Антипортер необходим для откачки из митохондрий в цитоплазму того АТФ, который образуется при окислительном фосфорилировании. Электрофоретический характер антипорта нуклеотидов через мембрану энергизованных митохондрий облегчает выход АТФ из митохондрий и вход в них АДФ. Кроме того, повышается цена энергии гидролиза АТФ в цитозоле из-за роста отношения АТФ/АДФ в этом отсеке клетки. Последнее сдвигает все АТФ-зависимые процессы в сторону использования АТФ. Тем самым оказывается возможным совершить дополнительную работу.

Если окислительное фосфорилирование выключено, например, анаэробно, тот же самый механизм антипорта предотвращает истощение гликолитического АТФ H^+ -АТФ-синтазой, действующей в обратном (АТФазном) направлении. Чтобы войти в митохондрию, внешний АТФ должен двигаться против поля, создаваемого H^+ -АТФазной реакцией.

Есть некоторые указания косвенного характера, что АТФ/АДФ-

антипортер как-то участвует в регуляции энергетического обмена. Найдено, в частности, что ацилы жирных кислот и СоА специфично и эффективно тормозят антипортер [1553]. Биологический смысл этой регуляции неясен. По данным А. В. Панова [1164], проводимость митохондриальной мембраны снижается при добавлении небольших количеств АДФ, причем атрактилозид или ацил-СоА снимают действие АДФ. Возможное значение регуляции этого типа мы обсудим ниже в связи с функцией разобщенного дыхания в терморегуляции (раздел 5.4.2).

Интересно сравнить субстратную специфичность АТФ/АДФ-антипортера и H^+ -АТФ-синтазы. Первый взаимодействует только с адениннуклеотидами, вторая также и с гуаниннуклеотидами. Поэтому GTP, образованный внутри митохондрий при окислительном фосфорилировании гуанозиндифосфата, не может, в отличие от АТФ, быть немедленно откачен антипортером в цитозоль. Сначала требуется перебросить фосфорил с GTP на АДФ посредством нуклеозиддифосфаткиназы и лишь затем полученный АТФ подлежит обмену на цитоплазматический АДФ. Сказанное относится также к субстратному фосфорилированию при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутарата, при котором образуется GTP. Ингибировав нуклеозиддифосфаткиназу матрикса, можно предотвратить использование GTP_{внутри} немитохондриальными потребителями энергии.

Удивительно, что АТФ/АДФ-антипортер, легко отличающий АТФ от GTP, по-видимому, может принять за АТФ PP_i^{4-} . Описан обмен $\text{ADP}_{\text{наруж}}^{3-}$ на $(\text{PP}_i^{4-})_{\text{внутри}}$, чувствительный к ингибиторам АТФ/АДФ-антипортера [195, 416].

Дюпон и соавт. [513] описали условия, в которых АТФ/АДФ-антипортер в митохондриях генерирует, а не потребляет $\Delta\psi$. Авторы изучали митохондрии мутанта дрожжей, лишённого как дыхательной цепи, так и H^+ -АТФ-синтазы. Было найдено, что обмен $\text{ATP}_{\text{наруж}}$ на $\text{ADP}_{\text{внутри}}$ образует $\Delta\psi$ порядка 55 мВ. Высказано предположение, что этот $\Delta\psi$ необходим для импорта белков в митохондрии мутанта (см. ниже раздел 5.2.8.1).

Данные в пользу присутствия АТФ/АДФ-антипортера в мембране оболочки хлоропласта были недавно получены Уолдегисом и соавт. [1618]. Это антипортер оказался чувствительным к бонгкрековой кислоте, но устойчив к карбоксиантрактилозиду.

АТФ/АДФ-антипортер — не единственный митохондриальный переносчик адениннуклеотидов, хотя он и отвечает за транспорт главной массы АТФ и АДФ через мембрану митохондрий. В этих органеллах описан также механизм поглощения $\text{ATP}_{\text{наруж}}$ или $\text{ADP}_{\text{наруж}}$ за счет энергии ΔpH [175, 195]. Вероятно, процесс описывается симпортом АТФ (или АДФ) и H^+ . Действие такой системы приводит к увеличению общего количества адениннуклеотидов в матриксе, что может быть необходимо при росте и размножении митохондрий. Возможно также, что механизм погло-

щения нуклеотидов нужен для компенсации спонтанной утечки их из матрикса. Некоторая утечка анионных форм АТР и АДФ неизбежна. Направление электрического поля во внутренней мембране благоприятно для выхода анионов из митохондрий, а никакая мембрана не может быть идеальным барьером, абсолютно непроницаемым для водорастворимых веществ.

Особая система переноса адениннуклеотидов была обнаружена в цитоплазматической мембране бактерии *Rickettsia prowazekii*, внутриклеточного паразита эукариот, вызывающего эпидемический тиф. Бактерия располагает H^+ —АТРазой и с помощью этого фермента поддерживает $\Delta\bar{p}H$ на своей мембране. АТР, образуемый клеткой хозяина, служит энергетическим ресурсом для *R. prowazekii*. Поэтому антипорт АТР/АДФ, если он обеспечивает поток АТР в бактерию и поток АДФ в другую сторону, должен быть организован иначе, чем в митохондриях, чтобы обеспечить противоположную направленность процесса транспорта нуклеотидов [1605].

Импорт АТР был обнаружен также у *Bdellovibrio bacteriovorus* [1280]. Эта бактерия — рекорсмен по скорости движения среди прокариот. Плывая с большой скоростью, *B. bacteriovorus* убивает другие микроорганизмы, сталкиваясь с ними и пробивая их клеточную стенку. Оказавшись внутри клетки, *B. bacteriovorus* поглощает АТР своей жертвы.

5.2.7.3. Митохондриальный $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортер

Не только АДФ, но и фосфат, другой субстрат H^+ —АТР-синтазы, может накапливаться митохондриями. Движущей силой транспорта фосфата служит ΔpH . Процесс описывается как симпорт аниона $H_2PO_4^-$ и иона H^+ . Вместе с электрофоретическим ATP^{4-}/ADP^{3-} -антипортом эта система осуществляет перенос в митохондрии ADP^{3-} , $H_2PO_4^-$ и H^+ в обмен на ATP^{4-} матрикса.

$H_2PO_4^-$, H^+ -симпортер изолирован в чистом виде и встроен в протеолипосомы [1615]. Это основной белок массой порядка 30 кДа [1613] и $pI = 8$ [375]. Ионы $H_2PO_4^-$ и H^+ связываются в двух разных центрах [1614]. N-этилмалеимид — очень активный и довольно специфичный ингибитор $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортера. В определенных условиях N-этилмалеимид блокирует кроме $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортера только глутамат/аспартат-антипортер, хотя известно, что он связывается с SH-группами целого ряда белков внутренней митохондриальной мембраны [962, 1177]. Для работы переносчика необходим кардиолипин [1018]. Антибиотик доксорубин, вызывающий отмешивание кардиолипина от других мембранных компонентов, тормозит симпорт [375]. Процесс блокируется также посредством ДЦКД [742].

Наряду с $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортером в мембране митохондрий обнаружены и другие системы переноса фосфата. В разделе 5.2.5 мы уже упоминали антипортер, обменивающий HPO_4^{2-} на анионы дикарбоновых кислот. Кроме того, фосфат может экспортироваться из митохондрий электрофоретически [199, 1177]. Этот унипорт блокируется теми же реагентами на SH-группы, что и $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортер. Может быть, в обоих процессах участвует один и тот же белок [1177].

$H_2PO_4^-$, H^+ -симпортер описан также у бактерий. Митчелл был пионером этого направления исследований. Еще в 50-е годы он описал обмен фосфата между средой и цитоплазмой *Staphylococcus aureus* и показал, что этот процесс тормозится ртутьсодержащими соединениями и разобщителями [1040, 1041]. Впоследствии наблюдения Митчелла были подтверждены другими исследователями. Была описана также и какая-то иная бактериальная система переноса фосфата, репрессируемая при $[P_i]_{\text{наруж}} > 1$ мМ. Она требует присутствия периплазматического фосфатсвязывающего белка массой 42 кДа и устойчива к разобщителям (см. обзор: [1177]).

В оболочке хлоропластов обнаружен фосфат/3-фосфоглицерат-антипортер [705]. Он напоминает митохондриальный $H_2PO_4^-$, H^+ -симпортер по молекулярной массе (29 кДа) и по чувствительности к *p*-диазобензосульфонату [565]. Баланс зарядов и протонов при антипорте остается неясным.

5.2.8. Роль $\Delta\bar{p}H$ в транспорте макромолекул

Одна из наиболее интригующих проблем мембранологии и биоэнергетики состоит в том, каким образом биологические макромолекулы (а именно белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды) переносятся через гидрофобный барьер сопрягающих мембран, непроницаемый даже для такой небольшой частицы как ион H^+ .

Твердо установлено, что процессы транспорта макромолекул происходят без разрушения мембраны, поскольку найдено, что они обеспечиваются энергией $\Delta\bar{p}H$ или одной из ее составляющих. Скорость транспорта некоторых макромолекул очень высока. Как ясно из предыдущих разделов, вопрос о механизме транспорта низкомолекулярных соединений все еще ожидает своего решения. Однако в ряде случаев переносчики уже идентифицированы, выделены и встроены в протеолипосомы. Для некоторых из них уже выяснена аминокислотная последовательность. Применительно к транспорту макромолекул переносчики еще не идентифицированы.

Если говорить о транспорте белков через мембраны, то здесь наиболее изучены две модели: импорт в митохондрии (хлоропласты) белков, синтезируемых в цитозоле, и экспорт из бактериальной

цитоплазмы белков, предназначенных для периплазмы и внешней мембраны.

С проблемой транспорта белков тесно связан вопрос о механизме встраивания в мембрану вновь синтезируемых трансмембранных белков. Чтобы расположиться нужным образом в мембране, определенные домены этих белков должны пересечь гидрофобный барьер.

5.2.8.1. Транспорт митохондриальных белков. Биогенез митохондрий

Как правило, белки, синтезируемые в цитозоле и затем импортируемые в митохондрии, образуются в виде более крупных предшественников, содержащих добавочную аминокислотную последовательность с N-конца полипептидной цепи [1968]. Такая последовательность, называемая лидером, может иметь массу от 0,5 до 10 кДа. Как видно из табл. 14, длина лидера не коррелирует с типом «адреса», по которому направляется белок в митохондрии: в матрикс, во внутреннюю или внешнюю мембрану либо в межмембранное пространство. Кроме того, различные субъединицы одного и того же ферментного комплекса могут иметь лидерные последовательности разной длины [695].

В ряде случаев выяснена аминокислотная последовательность лидера. Так, лидер субъединицы 9 фактора F_0 из митохондрий нейроспоры содержит 66 аминокислот. Он гораздо основнее и более гидрофилен, чем сам протеолипид. Лидер цитохром *c*-пероксидазы дрожжевых митохондрий также более основен, но в отличие от лидера протеолипида он содержит гидрофобную последовательность из 23 аминокислотных остатков (10 из них — аланины), которая могла бы образовать трансмембранную α -спиральную колонну. Лидер орнитинтранскарбамилазы как и в двух предыдущих случаях более основен. Он включает последовательность Leu—Arg—Phe—Leu—Leu—Asn—Lys—Ala—Ala—Phe—Arg—Asn [740], гомологичную таковой в лидере β -субъединицы фактора F_1 , а именно Ala—Glu—Leu—Leu—Leu—Arg—Ala—Val—Arg—Arg [1135]. Обе эти последовательности показательны в том отношении, что на отрезке в 10—12 остатков имеются три положительно заряженные аминокислоты и 7 гидрофобных аминокислот. В то же время предшественник аспартатаминотрансферазы — более кислый, чем зрелый белок [695]. (О возможной причине этого обстоятельства см. ниже раздел 5.2.8.3.)

В некоторых случаях, когда лидер отсутствует, показано, что белок-предшественник имеет иную конформацию, чем зрелый белок. Это продемонстрировано, в частности, для АТФ/АДП-антипортера и одного из белков внешней митохондриальной мембраны — порина (рис. 88, случаи 1 и 3). Показано, что информация, необходимая для направления АТФ/АДП-антипортера во внут-

Таблица 14. Некоторые митохондриальные белки и их предшественники, синтезируемые в цитоплазме (по: Хэй и соавт. [695])

Белок	Организм	Молекулярная масса, кДа	
		Предшественник	Зрелый белок
Матрикс			
Ацетил-СоА-тиолаза	Крыса	41	38
Ацил-СоА-дегидрогеназа			
общая	»	41	39
жирных кислот с короткой цепью	»	41	36,5
Адренодоксин	Бык	20	12
Адренодоксинредуктаза	»	20	12
Синтаза δ -аминолевулиновой кислоты	Крыса	51	45
Аспартатаминотрансфераза	»	47	45
Фактор F ₁			
α -субъединица	Дрожжи	64	58
β -субъединица	»	56	54
γ -субъединица	»	40	34
Синтаза карбамоилфосфата	Крыса	165	160
Цитратсинтаза	Дрожжи	50	47
Эноил-СоА-гидратаза	Крыса	29,5	25
Глютаматдегидрогеназа	»	60	54
3-оксацил-СоА-дегидрогеназа	»	33	29,5
Синтаза 2-изопропилмалата	Дрожжи	65	65
3-кетацил-СоА-тиолаза	Крыса	38	38
Малатдегидрогеназа	»	38	37
Метилмалонил-СоА-мутаза	»	80,5	77,6
Орнитинаминотрансфераза	»	49	43
Орнитинкарбамилаза	»	39,5—43,0	36—39
Пропионил-СоА-карбоксилаза			
α -субъединица		74,5	70
β -субъединица	»	61,5	54
Субъединица РНК-полимеразы	Дрожжи	47	45
Mn ²⁺ -зависимая супероксиддисмутаза	»	26	24
Внутренняя мембрана			
АТФ/АДР-антипортер	Крыса	32	32
Субъединица 9 фактора F ₀	Нейроспора	14	8
Ацетилкарнитинтрансфераза	Крыса	69	67,5
Цитохром Р-450, специфичный к холестерину	Бык	54,5	49

Таблица 14 (окончание)

Белок	Организм	Молекулярная масса, кДа	
		Предшественник	Зрелый белок
Цитохромоксидаза			
субъединица IV	Дрожжи	17	14
» V	»	15	12,5
» VI	»	17—20	12,5
» VII	»	5,0—7,5	5,0—7,5
» IV	Крыса	18,0—19,5	16,5
» V	»	15,5	12,5
β -Оксибутиратдегидрогеназа	Крыса	37	32
CoQH ₂ -цитохром c-редуктаза			
субъединица I	Дрожжи	44,5	44
» II	»	40,5	40
» V	»	27	25
» VI	»	25	17
» VII	»	14	14
» VIII	»	11	11
Цитохром c ₁	»	35	31
Межмембранное пространство			
Аденилаткиназа	Курица	28	28
Цитохром c	Нейроспора	12	12
Цитохром c-пероксидаза	Дрожжи	39,5	33,5
Цитохром b ₂	»	68	58
Сульфитоксидаза	Крыса	59	55
Внешняя мембрана			
Моноаминоксидаза	»	59	59
Порин	Дрожжи	29	29
70 кДа-белок	»	70	70
45 кДа-белок	»	45	45
14 кДа-белок	»	14	14
Белок OMM-35	Крыса	35	35

ренную мембрану митохондрий, заключена где-то в пределах первых 115 аминокислот этого белка [152].

Цитохром c, также не имеющий лидерной последовательности, проходит в межмембранное пространство митохондрии в виде апофермента и получает гем только по прибытии на место своего назначения (см. рис. 88, случай 2). Образование холоцитохрома c

сопровождается сильным конформационным изменением, делающим невозможным возвращение этого белка в цитозоль (см.: [695]).

Во многих случаях было показано, что митохондриальные белки синтезируются на свободных полисомах [695]. Тем самым транспорт этих белков, имеющий, как правило, энергозависимый характер [596, 597, 747, 749, 869, 1099, 1320, 1500], должен обеспечиваться необходимой энергией на каких-то посттрансляционных этапах.

Достигнув места назначения, белок-предшественник становится объектом действия лидер-пептидазы, специфического протеолитического фермента, требующего ионы металла для своей активности. Лишившись лидера, предшественник превращается в зрелый белок. Измерено время жизни предшественников. Оно оказалось сравнительно коротким (1 мин или даже короче) [695].

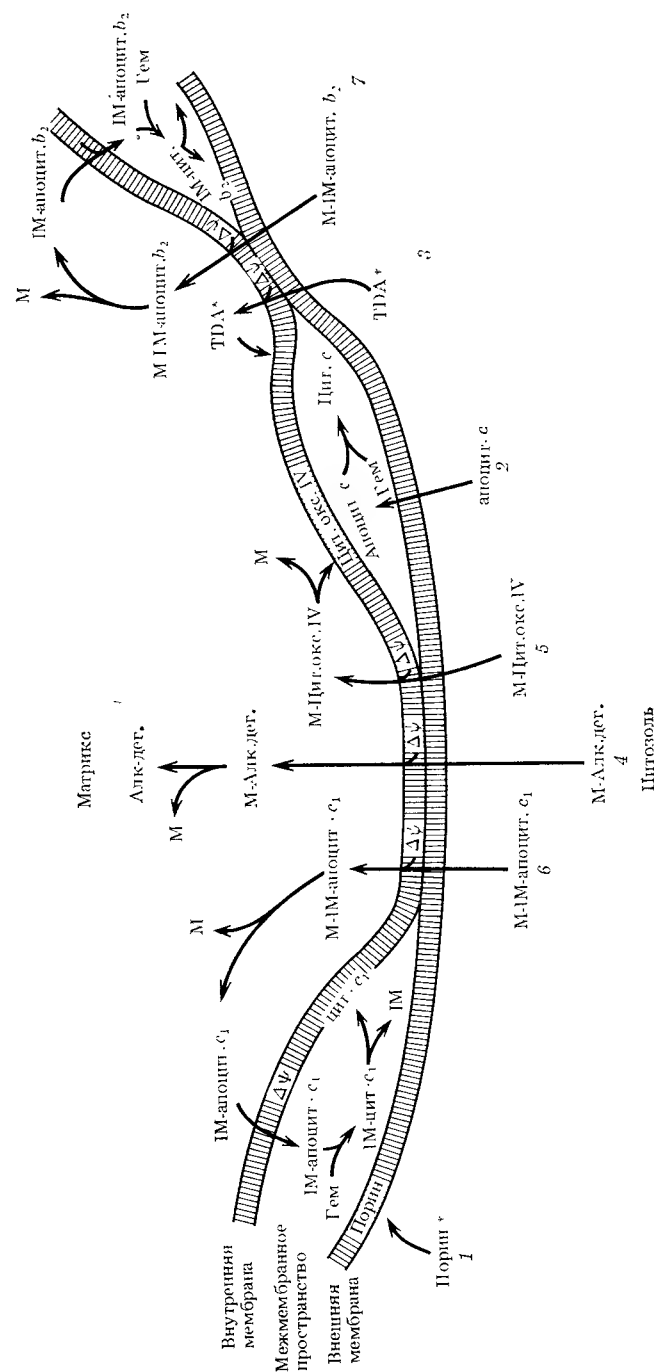
Для некоторых белков уже показано, что есть специальные рецепторы, локализованные во внешней мембране митохондрий.

Пузырьки, полученные из внешней митохондриальной мембраны, специфически связывают белки-предшественники, причем этот процесс не требует энергии [1257]. По всей вероятности, существует несколько рецепторов, каждый из которых специфичен к определенной группе импортируемых белков [695, 1171, 1639, 1654].

Транспорт апоцитохрома c, по всей вероятности, служит примером простейшего случая, когда внутримембранный белок сначала связывается с рецептором, а затем переносится через внешнюю мембрану в межмембранное пространство не зависящим от энергии способом.

Ситуация гораздо сложнее для другого межмембранного белка — лактатдегидрогеназы дрожжевых митохондрий (другое название — цитохром b₂). Предшественник этого водорастворимого фермента массой 68 кДа в виде апобелка сначала связывается с рецептором, затем достигает митохондриального матрикса энергозависимым образом и теряет там часть своей лидерной последовательности, так что образуется белок массой 65 кДа. Последний, образовавшись, вторично пересекает внутреннюю мембрану (но уже в противоположном направлении), чтобы попасть из матрикса в межмембранное пространство. Здесь 65 кДа-белок связывается гем, атакуется межмембранной лидер-пептидазой и укорачивается еще раз, превращаясь в зрелый холофермент массой 58 кДа (см. рис. 88, случай 7) [355, 432, 597].

Аналогичная цепь событий имеет место при транспорте цитохрома c₁, белка внутренней мембраны, большая часть которого расположена на внешней поверхности этой мембраны [597, 933]. Предшественник цитохрома c₁ массой 35 кДа сначала переносится через две мембраны в матрикс, здесь укорачивается лидер-пептидазой матрикса с образованием 34 кДа-белка, переносится через внутреннюю мембрану из матрикса в межмембранное про-



странство. Здесь он связывает гем и расщепляется местной лидер-пептидазой, давая зрелый холофермент массой 31 кДа. Твердо установлено, что энергия требуется для входа в матрикс 35 кДа-предшественника [597, 1132, 1500]. Что же касается переноса промежуточной формы предшественника (34 кДа), то есть данные, полученные в опытах *in vivo*, что этот процесс тормозится разобщителем-протонофором [1500].

Процессинг цитохрома c_1 показан на рис. 88, случай 6. Такой сложный механизм становится понятным, если предположить, что энергозависимый импорт белков в митохондрии происходит через те места внутренней мембраны, где она сливается с внешней мембраной [1319]. В подобном случае любой белок, транспортирующийся в митохондрии энергозависимым образом, прежде всего попадает в матрикс. Поэтому предшественнику приходится дважды пересекать внутреннюю мембрану, чтобы достичь межмембранного пространства.

Недавно был описан пример, когда даже белок внешней мембраны достигает места своего назначения, сначала побывав в матриксе. Исследовали транспорт химерного белка, составленного из β -галактозидазы *E. coli* и белка массой 70 кДа из внешней мембраны дрожжевых митохондрий. Было установлено, что химер-

Рис. 88. Транспорт в митохондрии белков, синтезированных в цитозоле

Показаны семь основных случаев, различающихся по механизму транспорта. 1 — порин синтезируется без какой-либо лидерной последовательности и прямо встраивается во внешнюю мембрану митохондрии. Встраивание требует специального белка-рецептора, локализованного во внешней мембране, и сопровождается конформационным переходом (порин* → порин). Процесс не нуждается в энергизации мембраны; 2 — апоцитохром c связывается с особым рецептором, локализованным во внешней мембране и переносится в межмембранное пространство. Энергизации мембраны не требуется. В межмембранном пространстве апоцитохром c связывает гем с образованием холоцитохрома c , который уже не узнается рецептором и не может пройти через мембрану; 3 — АТФ/АДФ-антипортер в конформации (ТДА*), отличной от той, которая характерна для него в мембране, переносится в матрикс энергозависимым способом. По неизвестной причине в матриксе происходит изменение конформации ТДА* → ТДА. Образованный ТДА встраивается во внутреннюю мембрану. В этом и во всех последующих случаях: а) транспортируемый белок узнается рецептором во внешней мембране и б) транспорт происходит без промежуточного освобождения белка в межмембранное пространство (но-видимому, белок переносится через места слияния внешней и внутренней мембран); 4 — предшественник алкогольдегидрогеназы (Алк. дет.) содержит лидерную последовательность М, которая служит адресом матрикса. М-Алк. дет. пересекает две мембраны энергозависимым способом. В матриксе М отщепляется лидер-пептидазой, и образуется зрелая алкогольдегидрогеназа; 5 — предшественник субъединицы IV цитохромоксидазы (М-Цит. окс. IV), синтезирующейся в цитозоле, транспортируется и процессируется, как в случае 4, но продукт встраивается во внутреннюю мембрану; 6 — предшественник апоцитохрома c_1 содержит сразу два адреса: первый — адрес матрикса (М) и второй — межмембранного пространства (ИМ). Предшественник вначале транслируется и процессируется, как в случае 4, но после отщепления М переходит из матрикса в межмембранное пространство. Транспорт требует энергии. В межмембранном пространстве ИМ-апоцит. c_1 связывает гем и расщепляется межмембранной лидер-пептидазой на цитохром c_1 и ИМ. Полученный цитохром c_1 сорбируется на внешней поверхности внутренней мембраны; 7 — как 6, но зрелый белок не встраивается в мембрану

ный белок, добавленный к митохондриям, направляется во внешнюю мембрану. Такой же оказывается судьба β -галактозидазы, соединенной с N-концевой частью 70 кДа-белка, содержащей 61 аминокислотный остаток. Если же N-концевой пептид сократить до 21 остатка, то β -галактозидаза направляется в матрикс [690].

Очень наглядный пример использования химерных белков можно найти в недавней работе Шаца и его коллег [747, 749, 1312]. Авторам удалось получить удлиненное производное немитохондриального белка — дигидрофолатредуктазы, к которой была присоединена лидерная последовательность цитохрома c_1 . Было найдено, что этот белок, будучи добавленным к суспензии дрожжевых митондрий, процессируется в два этапа с образованием исходной дигидрофолатредуктазы, которая оказывается в межмембранном пространстве. Затем аналогичный опыт был поставлен с химерным белком, содержащим дигидрофолатредуктазу и конечную часть лидера цитохрома c_1 , лишенную пептида из 19 аминокислот, который, по-видимому, располагается трансмембранно и необходим для переноса белка из матрикса в межмембранное пространство. В этом случае дигидрофолатредуктаза направлялась в матрикс и уже не покидала его.

В той же лаборатории были получены производные дигидрофолатредуктазы, содержащие лидер субъединицы IV цитохромоксидазы (фермент внутренней мембраны) или алкогольдегидрогеназы (фермент матрикса) (см. рис. 88, случаи 5 и 4). В соответствии с предсказанием рассматриваемой схемы дигидрофолатредуктаза в обоих случаях направлялась в матрикс. Варьируя длину лидера субъединицы IV, Шац и его сотрудники показали, что первые 12 аминокислот, т. е. менее половины лидерной последовательности, достаточны для направления дигидрофолатредуктазы в матрикс [747, 749].

Подобные соотношения были описаны также Гурвичем и соавт. [750] для химерного белка, составленного из дигидрофолатредуктазы и лидера орнитинтранскарбамилазы — фермента митохондриального матрикса.

Очень мало известно о встраивании во внутреннюю мембрану тех белков, которые синтезируются в матриксе. К белкам этого типа относится небольшое количество очень гидрофобных полипептидов, принадлежащих следующим комплексам: NADH—CoQ-редуктазе (несколько полипептидов неизвестной функции), CoQH₂-цитохром c -редуктазе (цитохром b), цитохромоксидазе (субъединицы I—III) и H⁺—АТФ-синтазе (субъединица 9, или протеолипид). Все они образуются, по-видимому, сразу в зрелой форме. Вопрос о том, нужна ли энергия для их встраивания в мембрану, остается открытым.

Особый случай представляет собой субъединица 9 H⁺—АТФ-синтазы из митондрий *Neurospora crassa*. Показано, что данный белок синтезируется в цитозоле, а не в матриксе. Как уже отме-

чалось выше, субъединица 9 нейроспоры образуется в виде более длинного предшественника, отличающемся в этом отношении от субъединицы H⁺—АТФ-синтазы другого представителя грибов — дрожжей. Предшественник переносится в митохондрии энергозависимым способом [1320, 1323]. Интересно, что у нейроспоры гены, кодирующие субъединицу 9, есть как в ядре, так и в митохондриях, причем активен только ядерный ген.

Заключение о необходимости энергии в случаях 3—7 (в случае 6 дважды, см. рис. 88) базируется на наблюдениях, что импорт предшественников, синтезированных *in vivo* или добавленных *in vitro*, происходит, только если митохондриальная мембрана энергизована дыханием или гидролизом АТФ. Импорт полностью подавляется разобщителями или комбинацией ингибиторов дыхательной цепи и H⁺—АТФ-синтазы [596, 597, 695, 869, 1099, 1139, 1320, 1500].

Как было сообщено недавно Нойпертом [1101], энергия необходима лишь на стадии транслокации лидера. Остальная (т. е. большая) часть белка-предшественника проходит через мембрану без затраты энергии. Протеолитическое расщепление предшественника также от энергии не зависит [1653].

Интересен вопрос, в какой форме следует подать энергию, чтобы транслоцировать лидер. Наличие АТФ недостаточно, поскольку в отсутствие $\Delta\mu\text{H}$ импорт белков невозможен, даже если уровень АТФ высок как внутри, так и снаружи митондрий [583, 695]. Вероятнее всего, в большинстве случаев электрический компонент протонного потенциала ($\Delta\psi$) вызывает электрофорез положительно заряженной лидерной последовательности в направлении отрицательно заряженного матрикса (см.: [1188, 1320] и раздел 5.2.8.3).

Важный вывод, вытекающий из сказанного выше, состоит в том, что митохондрия не может образоваться самосборкой из составляющих ее компонентов. Она происходит только от другой митохондрии, подобно тому как клетка происходит от клетки. Необходимым условием для биогенеза митондрий служит наличие $\Delta\psi$ на ее внутренней мембране. Поскольку ни один из ферментов, образующих $\Delta\psi$, не может быть синтезирован самой митондрией, эта органелла обречена на гибель, когда она потеряет свой последний $\Delta\psi$ -образующий фермент, даже если в цитозоле будет избыток всех белков-предшественников.

Вот почему дрожжи, растущие в анаэробных условиях, сохраняют замкнутые мембранные пузырьки («промитондрии»), не содержащие дыхательной цепи, но способные к генерации $\Delta\psi$ посредством АТФ-ADP-антипортера и, может быть, также обращения H⁺—АТФ-синтазы, которая, по-видимому, присутствует там, хотя и в очень сниженном количестве. Аналогичная проблема — каким образом митондрии ρ^- -мутанта дрожжей могут импортировать белки, хотя они лишены не только дыхательной

цепи, но и H^+ —АТР-синтазы. Было показано, что такие митохондрии сохраняют $\Delta\bar{p}H$ на уровне около 20% от нормы [856]. Вероятно, этот потенциал образуется АТР/АДР-антипортером (см. выше раздел 5.2.7.2).

5.2.8.2. Транспорт бактериальных белков

Белки бактерий, локализованные в периплазме или внешней мембране, должны пересечь внутреннюю мембрану, чтобы прибыть по назначению. Кроме того, известно, что бактерии эскретируют некоторые ферменты во внешнюю среду. Все эти процессы наподобие импорта белков митохондриями. В обоих случаях транспортируемый полипептид содержит дополнительную лидерную последовательность, транспорт которой требует энергии [212, 402, 421, 431, 532, 1158, 1648].

Необходимость энергизации мембраны была специально исследована применительно к периплазматическим белкам, связывающим лейцин [421], лейцин, изолейцин и валин [402], мальтозу [1158], β -лактамазу [212, 421, 1158] и несколько белков внешней мембраны [1158]. В одной из этих работ, выполненной Циммерманом и Виклером [1648], был продемонстрирован транспорт белка через мембрану липосом. Предшественник белка А внешней мембраны (про-ОмрА) добавляли к липосомам, содержащим лидер-пептидазу в своем внутреннем пространстве. Лидер-пептидазу снаружи липосом предварительно разрушали трипсином. Оказалось, что такие липосомы отщепляют лидерную последовательность, образуя зрелый белок ОмрА. Поскольку в липосомах не было других белков, кроме лидер-пептидазы, полученный результат приходится объяснять одним из двух способов: 1) лидер-пептидаза не только отщепляет лидер, но и транспортирует про-ОмрА через мембрану; 2) про-ОмрА пересекает фосфолипидный бислой мембраны липосом без помощи других белков. Если реализуется вторая возможность, то нужно принять, что концепция белка-рецептора неприменима для случая транспорта про-ОмрА. В то же время возможно, что транспорт через мембрану исследованных липосом является артефактом. Так, он происходил в отсутствие $\Delta\bar{p}H$, хотя экспорт про-ОмрА из цитоплазмы бактериальной клетки требует $\Delta\bar{p}H$, как это было показано в опытах тех же авторов. Было бы интересно включить какой-либо $\Delta\bar{p}H$ -генератор в липосомы с лидер-пептидазой. Тем самым можно было бы выяснить, не является ли $\Delta\bar{p}H$ фактором, влияющим на такую количественную характеристику процесса, как скорость транспорта про-ОмрА через мембрану.

Эффекты, подобные описанным выше, были продемонстрированы в той же лаборатории при изучении процесса другого белка в *E. coli*, а именно предшественника белка оболочки бактериофага M13 (см. обзоры: [1387, 1648]).

По некоторым данным, $\Delta\bar{p}H$ необходим не только для экспорта определенных белков из цитоплазмы, но и для удержания цитоплазматических белков внутри бактериальной клетки. Показано, что в оболочке устойчивого к протонофорам мутанта *E. coli*, выращенного в присутствии протонофора, обнаруживается какой-то новый белок массой 42 кДа. Белок, найденный как в цитоплазматической, так и во внешней мембране клетки, оказался рибосомальным фактором элонгации $T_u(EF-T_u)$ [1343].

5.2.8.3. Роль $\Delta\bar{p}H$ в транспорте белков и их укладке в мембране

В некоторых случаях найдено, что $\Delta\bar{p}H$ или $\Delta\psi$ необходимы для правильного встраивания белка в мембрану. Вероятно, простейшим примером такого рода явления может быть $\Delta\psi$ -зависимое образование каналов в плоской фосфолипидной мембране при добавлении пептидного антибиотика аламетидина [522]. В этом случае $\Delta\psi$ необходима для электрофоретического перемещения заряженных групп аламетидина в мембране.

Асialogликопротеидный рецептор из печени и мелиттин, активное начало пчелиного яда, встраиваются в плоскую мембрану, только если на нее подано напряжение более 20 мВ. Мелиттин — короткий полипептид (26 аминокислот), так что нетрудно представить себе механизм $\Delta\psi$ -зависимого встраивания в мембрану, включающий трансмембранный электрофорез определенных участков этой молекулы (см. обзор: [1581]).

Уэйнштейн и соавт. [1581], суммируя несколько примеров ориентирующего действия $\Delta\psi$ на расположение полипептидов в мембране, сформулировали правило, что положительно заряженный домен локализуется на внутренней стороне, а отрицательно заряженный домен на противоположной (внешней) стороне цитоплазматической мембраны (рис. 89). На этом рисунке приведены некоторые белки цитоплазматической мембраны бактерий и внешней мембраны животных клеток. Как было показано в разделе 5.2.8.1, подобное правило применимо также к процессу транспорта белков-предшественников через внутреннюю мембрану митохондрий в направлении отрицательно заряженного матрикса. Лидерная последовательность митохондриальных белков отличается высокой основностью, так как содержит несколько положительно заряженных аминокислот. Именно эта часть белка-предшественника переносится энергозависимым образом. Остальная его часть обычно гораздо менее основна и не требует энергии для своего транспорта.

Возникает впечатление, что белки переносятся через мембрану электрофоретически, двигаясь под действием $\Delta\psi$ -составляющей $\Delta\bar{p}H$ (или $\Delta\bar{p}Na$). Этот вывод подтверждается данными нескольких лабораторий, свидетельствующих о торможении импорта белков в митохондрии при снижении $\Delta\psi$ валиномицином

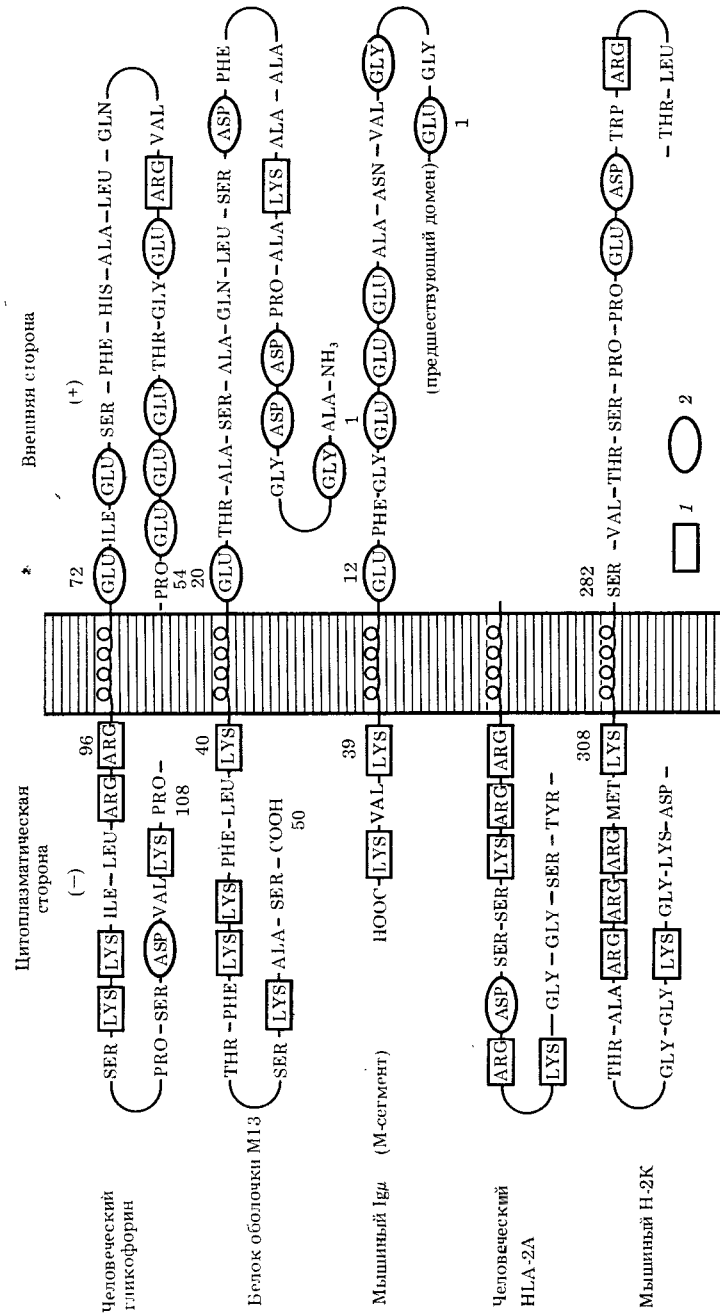


Рис. 89. Кластеры остатков заряженных аминокислот в трансмембранных белках. Каждый белок имеет преимущественно положительно заряженные аминокислоты (1) на цитоплазматической стороне мембраны и отрицательно заряженные (2) на противоположной стороне мембраны. В случае белка оболочки бактериофага M13 рассматривается цитоплазматическая мембрана бактерий. Во всех других случаях — внешняя мембрана животной клетки (по: Уайнштейн и др. [1581])

5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\mu\text{H}$

283

плюс K^+ (см. обзоры: [695, 748]). Не исключено, однако, что $\Delta\mu\text{H}$, получающаяся из $\Delta\psi$ при действии валиномицина, отчасти рассеивается за счет K^+/H^+ -антипорта, возникающего в митохондриях в определенных условиях. К сожалению, в опытах, упомянутых выше, $\Delta\mu\text{H}$ не измеряли. Другая возможность состоит в том, что набухание митохондрий при накоплении ими ионов K^+ может нарушать контакты двух митохондриальных мембран, которые, по-видимому, необходимы для транспорта белков (см. ниже).

Несмотря на все эти оговорки, электрофоретическая модель в настоящее время — простейшая из возможных. Недавно она получила серьезное подтверждение в опытах Пфаннера и Нойперта [1188]. По данным авторов, импорт митохондриальных белков может поддерживаться искусственно созданной $\Delta\psi$, но не $\Delta\mu\text{H}$, которую образовывали при добавлении валиномицина к митохондриям, нагруженным ионами K^+ и инкубируемым в бескальциевой среде. Диффузионный потенциал K^+ и поддерживаемый этим потенциалом импорт белков лишь частично снижались при добавлении разобщителя-протонофора.

Суммируя все эти наблюдения, мы можем заключить, что в белковом транспорте положительно заряженный лидер играет роль, подобную роли карнитина в переносе жирных ацилов. Оба они, лидер и карнитин, напоминают по своей функции электровоз, использующий электрическую тягу, чтобы везти железно-дорожный состав, который много больше его по размеру и сам по себе неподвижен.

В митохондриях исключение из правила составляет аспартаминотрансфераза, которая импортируется под действием $\Delta\mu\text{H}$, а не $\Delta\psi$ [1172]. Предшественник этого белка — более кислый, чем сам белок. Может быть, в данном случае кислые аминокислоты, содержащиеся в лидерной последовательности, протонируются при связывании с внешней поверхностью мембраны и депротонируются после того, как лидер пересекает мембрану и появляется на внутренней ее стороне. В таком случае $\Delta\mu\text{H}$ оказывается движущей силой транспорта.

Интересный вопрос состоит в том, каким образом лидеры функционируют в системе экспорта белков из цитоплазмы бактериальной клетки. Если лидер заряжен положительно, как это было показано для предшественника белка оболочки фага M13, он должен вызывать импорт, а не экспорт белка, поскольку направление электрического поля в бактерии и митохондриях одно и то же. Чтобы объяснить экспорт, Копеланд и соавт. [402] предложили «модель гарпуна», постулировав, что две N-концевые α -спиральные заряженным лидером на цитоплазматической стороне мембраны и отрицательно заряженным кластером, образующим связку между колоннами на периплазматической стороне. По этой гипотезе

лидер нужен для правильной ориентации «гарпуна» в мембране.

Авторы рассчитали вероятные затраты энергии ($-\Delta G$) на перенос некомпенсированных электрических зарядов из воды в гидрофобную сердцевину мембраны и сравнили его с выигрышем энергии ($+\Delta G$), сопровождающим образование правильной структуры. Оказалось, что $-\Delta G$ и $+\Delta G$ могут быть одного порядка. Копеланд и соавт. [402] отмечают, что подавляющее большинство белков, экскретируемых *E. coli*, характеризуются $pI < 7$, так что они могут электрофоретически выбрасываться из цитозоля под действием электрического поля, достигающего в цитоплазматической мембране величины 10^5 В·см.

В рамках этой концепции транспорт белка через мембрану организован по принципу «самообслуживания»: белку не нужен специальный переносчик после того, как он попал в сферу действия $\Delta\psi$ внутри мембраны. Вероятно, $\Delta\psi$ играет двойную роль: она, во-первых, позволяет белку расположиться в мембране так, чтобы затем двигаться электрофоретически, и, во-вторых, поддерживает сам процесс электрофореза. Однако нельзя исключить, что $\Delta\psi$ выполняет только первую из названных функций, а транслокация основной массы белка происходит независимо от энергии (см. выше опыты Нойперта, показывающие, что $\Delta\psi$ необходима только для транслокации лидера). Подобная ситуация вряд ли неожиданна, поскольку при транспорте белка через мембрану обычно не происходит образования большого градиента концентрации транспортируемого белка. Сказанное означает, что лимитирующим фактором переноса белка служит кинетика, а не термодинамика процесса.

В случае транспорта по крайней мере некоторых белков возможно участие переносчика. Например, Баккер и Рэндал [212] недавно показали, что потребность в энергии процесса экспорта β -лактамазы из клеток *E. coli* покрывается за счет общей $\Delta\bar{p}H$ (эффективны как $\Delta\psi$, так и ΔpH). Этот эффект легко объяснить участием специального белок/ H^+ -антипортера. Другое объяснение подобного рода данных могло бы состоять в том, что АТР служит непосредственным источником энергии для транспорта белка, а роль $\Delta\bar{p}H$ ограничивается образованием АТР посредством H^+ -АТР-синтазы. Именно такая точка зрения была высказана недавно Ченом и Таи [373], изучавшими транспорт щелочной фосфатазы и белка *OmpA* в субклеточных пузырьках *E. coli*.

Еще одна возможность — это необходимость $\Delta\bar{p}H$ для поддержания структуры мембраны в том состоянии, которое благоприятно для транспорта белка. Иными словами, $\Delta\bar{p}H$ — регулятор, а не движущая сила процесса транспорта. Такая возможность, в частности, обсуждалась Марино и соавт. [990]. Авторы исследовали транслокацию липополисахаридов из цитоплазмы во внешнюю мембрану *E. coli* и нашли, что для протекания этого процесса требуется как $\Delta\bar{p}H$, так и АТР. Известно также, что

транспорт фосфатидилэтаноламина по тому же маршруту также является энергозависимым (см. ссылки: [990]).

Совсем недавно группой Нойперта была продемонстрирована необходимость не только $\Delta\psi$, но также еще и АТР для транспорта митохондриальных белков [1189]. По-видимому, АТР требуется для разворачивания глобулы белка, подлежащего транспорту.

Как сообщили недавно Флюгге и Хинц [569], импорт белков в хлоропласты требует АТР, а не $\Delta\bar{p}H$. При этом, вероятно, АТР тратится на внешней стороне мембраны оболочки хлоропласта.

Неясно, нужна ли энергизация мембраны для транспорта белка через мембрану эндоплазматического ретикулума. В этом транспорте участвуют особые РНК-содержащие частицы [1573]. Есть косвенные указания на необходимость ΔpH для функционирования аппарата Гольджи и, может быть, также и эндоплазматического ретикулума (см. раздел 4.6). Чувствительность митохондриального импорта белков к рибонуклеазе [562] указывает на возможную общность механизмов трансмембранного переноса белков в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме.

5.2.8.4. Транспорт бактериальной ДНК

Нет сомнений, что должен существовать особый молекулярный механизм, транспортирующий ДНК через мембрану бактериальной клетки. Этот процесс может быть быстрым. Так, скорость переноса ДНК при инфекции бактерии фагом Т4 достигает $3 \cdot 10^3$ нуклеотидных остатков в секунду, или один нуклеотид за 330 мкс [646]. Это сравнимо со скоростью переноса электрона по дыхательной цепи. Перенос ДНК при конъюгации и генетической трансформации происходит несколько медленней: соответственно 600 и 55 нуклеотидных остатков в секунду [646], что все еще больше, чем скорость переноса нуклеотидов АТР/АДФ-антипортером (25 нуклеотидов в секунду [1553]). Транспорт ДНК часто сопровождается переносом особых «пилотных» белков [878]. Это означает, что мембрану пересекают большие молекулярные массы. В некоторых случаях ДНК переносится в виде двойной спирали (см. обзор: [471]).

Рассматриваются три возможных источника энергии для транспорта ДНК: 1) АТР и другие высокоэнергетические соединения, 2) $\Delta\bar{p}H$ или составляющие ее компоненты и 3) взаимодействие ДНК, проникающей в клетку, с цитоплазматическими (гистон-подобными?) белками. Последняя возможность была постулирована Малтоуфом и Лабеданом [976]. Она основывается на наблюдении, что эти белки вызывают спонтанный переход ДНК в конденсированное состояние, сопровождающийся выделением энергии [897].

Роль $\Delta\bar{p}H$ и АТР была изучена Л. Л. Гринюсом и его сотрудниками в Вильнюсе. Было найдено, в частности, что истощение

фонда внутриклеточного АТР при инкубации с арсенатом не тормозит ни генетической трансформации, ни инфекции бактерий фагом Т4 [369, 809]. В то же время конъюгация тормозилась арсенатом [21]. Что касается $\Delta\bar{p}H$, то она оказалась необходимой во всех трех случаях. В частности, это было показано для трансформации *B. subtilis* [369], инфекции *E. coli* фагом Т4 [69, 808—810] и конъюгации [21, 647] (см. обзоры: [47, 645, 646]).

Позднее эти наблюдения были подтверждены в других лабораториях. Так, Бремер и соавт. [302, 1547] нашли, что вызывающий трансформацию перенос ДНК в клетки *B. subtilis* или *Haemophilus influenzae* зависит от $\Delta\bar{p}H$, причем эффективны и $\Delta\psi$, и ΔpH (см. также [646]). То же явление было показано А. Г. Сабельниковым и И. В. Домарадским [1285]. Лабедан и соавт. [895, 896] подтвердили, что $\Delta\bar{p}H$ необходима для инфекции фагом Т4, но, по их мнению, действующим компонентом служит $\Delta\psi$, а ΔpH неэффективна (см., однако, [810]). Группе Лабедана не удалось показать необходимость $\Delta\bar{p}H$ для инфекции фагом Т5, хотя этот фаг, подобно фагу Т4, стимулировал дыхание бактерий, как если бы энергия дыхания тратилась на транспорт ДНК [976]. Последний эффект мог быть, однако, обусловлен не переносом ДНК через мембрану, а какими-то сопутствующими событиями. Так, было показано, что «тени» фага Т4, не содержащие ДНК, также стимулируют дыхание, сорбируясь на бактериальных клетках [912]. По данным Зимкуса и соавт. [65], инфекция фагом Т7 блокируется разобщителем-протонофором, что указывает на необходимость $\Delta\bar{p}H$. В то же время транспорт ДНК фага λ в *E. coli* оказался энергонезависимым процессом [977].

Складывается впечатление, что в одних случаях $\Delta\bar{p}H$ необходима для транспорта ДНК, а в других случаях этот процесс происходит в отсутствие $\Delta\bar{p}H$, а также и других источников энергии. По-видимому, бактерии располагают различными механизмами переноса ДНК через мембрану. (Об энергонезависимом транспорте ДНК в липосомы в присутствии Ca^{2+} см.: [31].)

Когда $\Delta\bar{p}H$ необходима, она может служить либо движущей силой транспорта, либо его регулятором, определяющим, например, правильную ориентацию транспортируемой ДНК или ДНК-белкового комплекса. Если $\Delta\bar{p}H$ является движущей силой, то механизм может быть устроен по принципу флагеллярного мотора (см. выше раздел 5.1.1.8 и следующую главу). Мысль о том, что $\Delta\bar{p}H$ нужна как движущая сила транспорта [645], представляется более вероятной в системах, где эффективны как $\Delta\psi$, так и ΔpH . Однако даже здесь нельзя исключить регуляторную природу эффекта, например, если он опосредован участием $\Delta\bar{p}H$ -сensors (протометра) (см.: [302] и раздел 6.1.5).

Почти ничего не известно об энергетике трансмембранного переноса нуклеиновых кислот в эукариотической клетке. Мно-

гообещающим представляется изучение переноса ДНК и РНК через внешнюю мембрану эукариот.

Другая интересная проблема — экспорт информационной РНК из ядра в цитоплазму. В этой связи можно упомянуть, что описан АТР-зависимый выход РНК из субъядерных пузырьков. В той же системе РНК стимулировала гидролиз АТР [1255].

5.3. Механическая работа за счет $\Delta\bar{p}H$: движение бактерий

В течение длительного времени молекулярный механизм механической работы живых организмов ассоциировали исключительно с АТРазами актомиозинового типа. Было доказано, что актомиозинподобные АТРазы ответственны не только за мышечное сокращение, но и за подвижность сперматозоидов, некоторых растений, грибов и простейших, а также за движение определенных внутриклеточных структур. В частности, АТР-зависимый механизм приводит в движение флагеллы, или жгутики, эукариотических клеток.

Когда стало ясно, что движение бактерий обусловлено вращением флагелл, простейшая трактовка этого эффекта, казалось, состояла в предположении об АТР-зависимом характере также и этого типа механической работы. Однако все попытки обнаружить АТРазную активность прокариотических флагелл были тщетными. Кроме того, выяснилось, что структуры про- и эукариотических флагелл совершенно различны. Принципиально другим оказался и механизм движения бактерий, использующий вместо АТР $\Delta\bar{p}H$ (в ряде случаев $\Delta\bar{p}Na$ — см. ниже раздел 7.2.2).

5.3.1. Структура флагеллярного мотора бактерий

Типичная флагелла бактерии состоит из филамента и базального тела, закрепленного в клеточной стенке. Филамент представляет собой жесткую левую спираль длиной в несколько микрометров (иногда до 20 мкм) и 12—20 нм в диаметре. Он построен из структурного белка флагеллина, молекулярная масса которого у разных видов колеблется от 25 до 60 кДа. Никакой ферментативной активности у флагеллина обнаружить не удалось. Молекулы флагеллина в филаменте упакованы таким образом, что получается полая трубка.

Филамент обычно крепится к базальному телу особой изогнутой структурой, называемой крюком. Это трубка несколько большего размера, чем филамент. Базальное тело состоит из стержня, сочлененного с крюком, и четырех (иногда трех или двух) дисков, как бы насаженных на стержень. Диаметр стержня меньше, а дисков больше, чем крюка (рис. 90 и табл. 15).

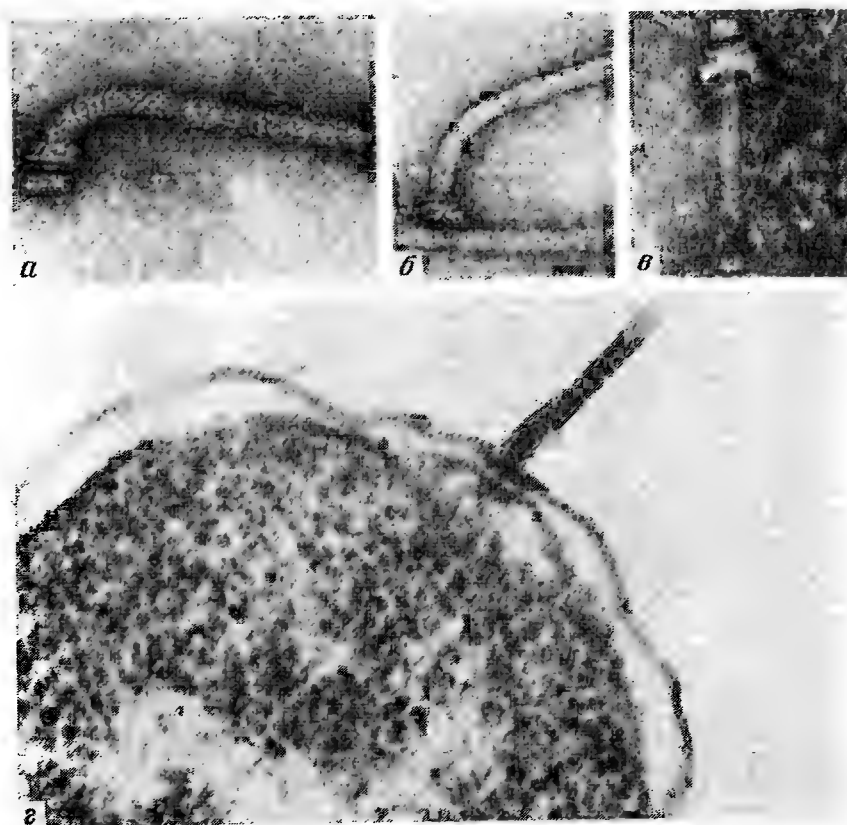


Рис. 90. Структура базальных тел бактериальных флагелл

Изолированные базальные тела:

- а — *E. coli*,
 б — *Bacillus brevis*,
 в — *Vibrio alginolyticus*;
 г — базальное тело *Vibrio alginolyticus* in situ;
 д — схема устройства базального тела *E. coli* (по: Новикова и соавт. [99]; Бакеева и соавт. [207] и Адлер [151])

Диски обозначаются буквами L, P, S и M, причем последний из них локализован в цитоплазматической мембране бактерии. В дисках *Salmonella typhimurium* обнаружены следующие белки: 27 кДа (L), 38 кДа (P) и 65 кДа (M). Белковый состав S-диска неизвестен. Кроме этих белков, базальное тело содержит также

Таблица 15. Размеры структур, образующих базальное тело бактериальных флагелл (нм)

Структурный параметр	H ⁺ -моторы					Na ⁺ -моторы	
	<i>E. coli</i> [99]	<i>Campylobacter foetus</i> [557]	<i>Aquaspirillum septens</i> [406]	<i>Spirillum volutans</i> [1477]	<i>Bacillus brevis</i> [99]	<i>Vibrio cholerae</i> [557]	<i>Vibrio alginolyticus</i> [207]
Диаметр дисков							
L	21	39	18	24	—	23	33
P	21	39	21	24	—	23	33
S	18	26	28	—	20	11	15
M	18	26	31	31	20	11	15
Отношение диаметров L : M	1,2	1,5	0,6	0,8	—	2,1	2,2
Диаметр стержня	11	—	10	12	8	8	8
Размер базального тела по вертикали	27	23	31	44	10	24	22

белки с массой 60 кДа (сочленение филамента и крюка), 42 кДа (крюк), 32 и 30 кДа (стержень), 16 и 14 кДа (локализация неизвестна) и, по-видимому, некоторые другие [154].

Иногда в бактериальной стенке видны кольца гораздо большего диаметра, чем диски базального тела. Их нет в препаратах очищенных базальных тел [557]. Можно предположить, что эти большие кольца являются компонентами статора, в то время как базальное тело есть роторная часть мотора.

По данным Свана, в месте прикрепления флагеллы *Spirillum volutans* к клеточной стенке имеется цилиндрическая структура диаметром около 36 нм, которая выступает на 19 нм в цитоплазму [1477]. Аналогичная структура была обнаружена в нашей лаборатории Л. Е. Бакеевой у *Vibrio alginolyticus*.

Было показано, что филамент не бьется, а совершает истинное вращательное движение вдоль своей длинной оси. Из-за того, что филамент обычно представляет собой левую спираль, флагелла, расположенная сзади, толкает клетку при вращении против часовой стрелки. Вращение по часовой стрелке тянет клетку в противоположную сторону, и она движется флагеллой вперед. Есть бактерии, имеющие много флагелл, как, например, *E. coli*. Вращение флагелл *E. coli* против часовой стрелки приводит к тому, что все они как бы сплетаются в жгут, вращение которого обуславливает поступательное движение клетки. При вращении по часовой стрелке жгут расплетается, флагеллы вращаются независимо одна от другой и клетка останавливается (см. обзор: [981]).

5.3.2. $\Delta\bar{p}H$ вращает ротор флагеллярного мотора

Еще в 1956 г. Митчел [1042] отметил принципиальную возможность того, что ионный градиент может вызвать движение бактерий. Было высказано предположение, что бактериальная флагелла играет роль гигантского ионного канала [1042, 1048]. Впоследствии эта конкретная схема была оставлена на основании расчета, показавшего ее неэффективность [1173]. Тем не менее общая идея локомоции, поддерживаемой энергией ионного градиента, получила экспериментальное подтверждение.

В 1974 г. Адлер и его коллеги [908] наблюдали движение мутанта *E. coli*, лишённого способности к окислительному фосфорилированию. Мутант был подвижен в условиях активного дыхания, хотя оно не могло быть сопряжено с синтезом АТР, уровень которого поддерживался гликолизом. Более того, сильное уменьшение концентрации АТР в клетке не снижало скорости движения мутанта. Клетки обездвиживались при добавлении разобщителя. Авторы заключили, что не АТР, а «нефосфорилированный интермедиант окислительного фосфорилирования» необходим для движения *E. coli*.

К тому времени для нас уже было ясно, что «нефосфорилированный интермедиант» — не химическое соединение, а $\Delta\bar{p}H$. Поэтому мы предприняли специальное исследование, чтобы прямо продемонстрировать новую функцию протонного потенциала. В 1975 г. мы подтвердили наблюдение Адлера, используя бактерию, весьма отдаленную от *E. coli* по своему систематическому положению, а именно *Rhodospirillum rubrum* [19, 1398]. Как оказалось, и в этом случае скорость движения не коррелирует с уровнем АТР. В то же время наблюдалась хорошая корреляция с величиной мембранного потенциала, образуемого фотосинтетической редокс-цепью. На основе этих данных мы заключили, что движение *Rh. rubrum* поддерживается энергией $\Delta\bar{p}H$, а не АТР. В дальнейшем наша группа [611, 1401] и две другие лаборатории [980, 1003] показали, что *Rh. rubrum*, один из видов стрептококка и *B. subtilis*, неподвижные в условиях, когда генерация $\Delta\bar{p}H$ естественным путем была невозможна, на несколько минут вновь приобретают подвижность, если на их мембране искусственно создается $\Delta\bar{p}H$ или $\Delta\bar{p}H$.

У *B. subtilis* подвижность появлялась при $\Delta\bar{p}H$ около 30 мВ. Скорость движения возрастала при повышении $\Delta\bar{p}H$ до 60 мВ. Дальнейший рост $\Delta\bar{p}H$ не влиял на скорость. У *E. coli* также был обнаружен порог, ниже которого бактерии оставались неподвижными. Однако возрастание скорости движения наблюдалось вплоть до величин $\Delta\bar{p}H$ порядка 200 мВ ([112, 840]; см. также [841])².

² Сравнивая величины $\Delta\bar{p}H$, полученные различными исследователями на различных видах и в различных условиях, мы должны иметь в виду, что все

Максимальные скорости движения различаются у разных видов. Наибольшая величина, а именно $140 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$, получена для *Vibrio bacteriovorus* [1458].

Для одной из монофлагеллярных псевдомоноад она равна $60 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$ [1327]. Перитрихальные (т. е. содержащие много жгутиков) бактерии обычно движутся со скоростью $20\text{—}30 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$ [969, 1327]. Скорость вращения флагеллы обычно колеблется в пределах $5\text{—}50$ оборотов в секунду, достигая 150 оборотов у *E. coli* в условиях, когда базальное тело вращается практически без нагрузки [246].

Важная особенность флагеллярного мотора — его способность вращать флагеллу как по часовой стрелке, так и против нее при неизменной направленности $\Delta\bar{p}H$. Переключение с одного направления вращения на другое контролируется системой таксиса. Добавление репеллента вызывает смену направления вращения: флагелла, вращавшаяся против часовой стрелки, начинает вращаться по часовой стрелке [245, 909, 970].

Одним из параметров, измеряемых системой таксиса, служит $\Delta\bar{p}H$. Таким образом, $\Delta\bar{p}H$ оказывается не только движущей силой, но и регулятором направления вращения ротора. Этот факт сильно осложняет изучение механизма работы флагеллярного мотора. Преодолеть затруднение удалось двумя различными путями.

В работах Берга и соавт. [524, 839, 981] был исследован подвижный мутант стрептококка, дефектный по системе таксиса. Оказалось, что изменение направления $\Delta\bar{p}H$, искусственно создаваемой на мембране мутанта, приводит к изменению направления вращения флагеллы. Этот эффект служит сильным доводом в пользу концепции, рассматривающей $\Delta\bar{p}H$ в качестве той формы энергии, которая непосредственно потребляется флагеллярным мотором. Крайне маловероятно, чтобы обратная $\Delta\bar{p}H$ вызывала вращение в обратную сторону, если между $\Delta\bar{p}H$ и мотором есть какой-то интермедиант типа высокоэнергетического соединения.

Другой подход был применен Эйзенбахом и Адлером [524, 1243]. Авторы получили «тени» клеток *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, сохраняющие оболочку и флагеллы, но лишённые цитоплазмы. «Тени» прикрепляли к стеклу, покрытому антителами к флагеллину. В результате приклеенная к стеклу флагелла вместе со своим ротором оказалась прочно закрепленной. В этих условиях включение мотора приводило к вращению статора, а с ним и «тени» бактериальной клетки, висющей на флагелле. Используя такую систему, лишённую цитоплазматической системы таксиса, авторы нашли, что как дыхание, так и искусственно созданная $\Delta\bar{p}H$ естественного направления поддерживает вращение против ча-

методы измерения $\Delta\bar{p}H$ в живых клетках остаются пока что косвенными. Поэтому упомянутое различие зависимости скорости движения от $\Delta\bar{p}H$ для двух бактерий может быть не столь велико, как это указано выше.

совой стрелки. К сожалению, искусственная $\Delta\bar{p}H$ обратного знака вращения не вызывала, что, по мнению авторов, было следствием необратимого повреждения мотора.

В группе Берга [839] были исследованы интактные клетки стрептококка, приклеенные флагеллами к стеклу. Искусственную $\Delta\bar{p}H$ создавали переносом K^+ по концентрационному градиенту в присутствии валиномицина, а искусственную ΔpH — подкислением или подщелачиванием инкубационной среды. Важнейший результат, полученный авторами, состоит в том, что вращательный момент флагеллярного мотора практически не зависит от температуры в исследованном интервале от 4° до 38° . По всей вероятности, работа мотора происходит без каких-либо конформационных изменений образующих его белков или каких-либо других событий, сопутствующих ферментативному катализу, который всегда сильно тормозится при таком значительном снижении температуры, как на 34° . Кроме того, можно заключить, что ротор прямо не контактирует с липидной фазой. Известно, что температурный сдвиг такого масштаба, как в опытах Берга, тормозит даже столь простой процесс, как проведение протонов через липидную мембрану низкомолекулярными разобщителями-протонофорами. Другой факт, отличающий мотор от ферментов, имеющий дело с ионами водорода, — отсутствие изотопного эффекта при замене H_2O на D_2O [839].

5.3.3. Возможный механизм H^+ -мотора

В 1978 г. мы предложили механизм устройства протонного мотора бактерий, показанный на рис. 91 [611]. Его более детальный вариант был недавно рассмотрен Митчелом [1055]. Согласно этой схеме, роль ротора играет последний диск (М), поскольку это единственный компонент базального тела, локализованный там, где есть $\Delta\bar{p}H$, т. е. в цитоплазматической мембране.

М-диск представляет собой идеальный цилиндр диаметром от 10 до 30 нм и высотой порядка 5 нм. Есть данные, что он составлен из 16 белковых субъединиц [444].

Предполагается, что в той же мембране закреплены некоторые компоненты статора. В нем имеются два протонных «колодца», каждый из которых пересекает часть толщины мембраны. На дне входного «колодца» находится протонакцепторная группа X, принадлежащая ротору, т. е. М-диску (это может быть, например, NH_2 -группа лизинового остатка белка, образующего М-диск). Появление положительного заряда на X при его протонировании вызывает кулоновское притяжение этой группы к другой протонакцепторной группе Y^- , скажем, ионизированному карбоксилу дикарбоновой аминокислоты, принадлежащей белку статора. Притяжение приводит к вращению М-диска и сближению XH^+ и Y^- .

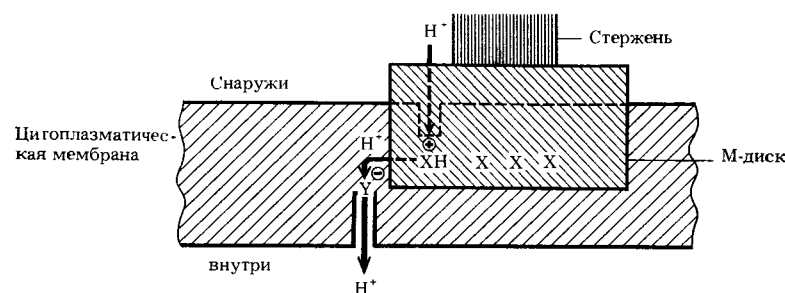


Рис. 91. Возможное устройство протонного мотора бактерий [611]

Объяснения см. в тексте

Перенос протона от XH^+ к Y^- и далее в цитоплазму по выходному «колодцу» завершает цикл. Теперь другой ион H^+ из периплазмы может протонировать следующую группу X, занявшую место на дне входного «колодца».

Схема предполагает, что на периферии М-диска расположена длинная цепь групп X, так что один оборот М-диска сопровождается переносом большого числа протонов из периплазмы в цитоплазму. По расчету Берга [246], один оборот ротора требует переноса около 200 ионов H^+ через мембрану в цитоплазму по градиенту $\Delta\bar{p}H = 200$ мВ. В рамках простой схемы, показанной на рис. 91, это означает, что число групп X на М-диске должно быть порядка 200. Поскольку радиус М-диска обычно около 10 нм, расстояние между двумя соседними группами X оказывается порядка 0,3 нм. Количество групп X будет меньшим, если в статоре имеется не одна, а несколько пар входных и выходных «колодцев».

Есть указание, что один из девяти белков, образующих базальное тело флагеллы, имеет рI в очень щелочной области (выше 9). Может быть, именно этот полипептид декорирован цепочкой из групп X.

Как уже отмечалось выше, во флагеллярном моторе предусмотрено переключение направления вращения ротора при неизменном знаке $\Delta\bar{p}H$. Чтобы объяснить это свойство мотора, надо дополнить схему на рис. 91 устройством, меняющим положение протонных «колодцев» относительно ротора таким образом, что в одном положении перенос протонов вращает ротор по часовой стрелке, а в другом — против. Эти два положения схематично показаны на рис. 92, а и б.

Вращение ротора в обратную сторону при изменении направленности $\Delta\bar{p}H$ у бестаксисного мутанта, изученного группой Берга, иллюстрируется рис. 92, в. Протонирование Y, X, а также еще одной протонакцепторной группы (Z) в начале выходного «колодца» цитоплазматическими ионами H^+ вызывает взаимное от-

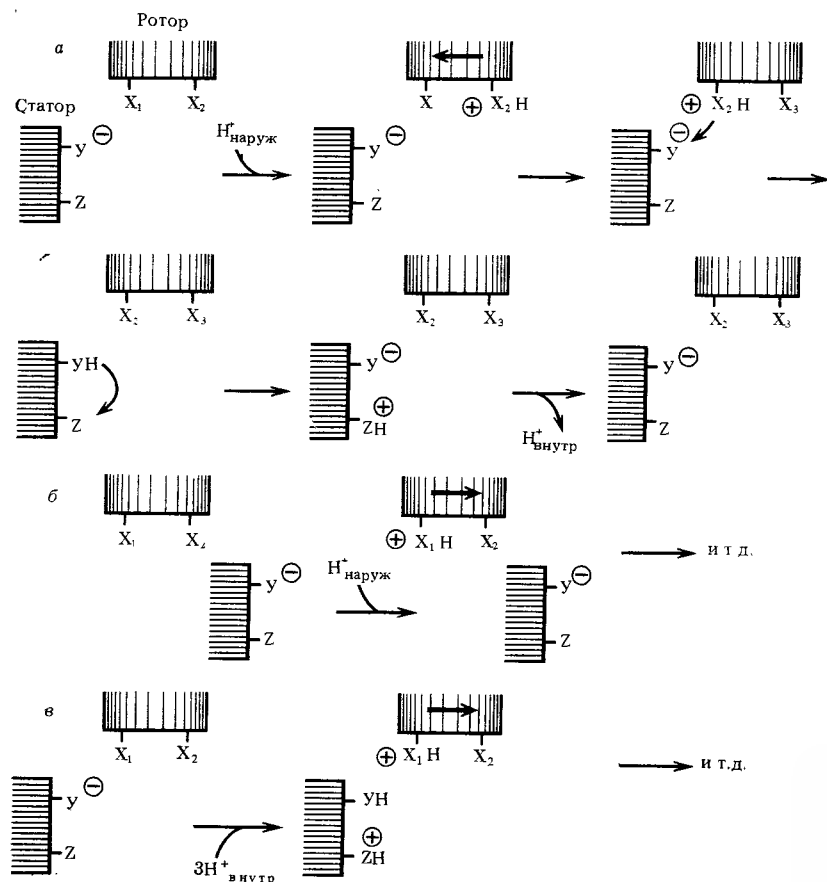


Рис. 92. Схема, иллюстрирующая соотношение между направлениями $\Delta\bar{p}H$ и вращения флагаеллы

а и б — $\Delta\bar{p}H$ естественного направления (цитоплазма заряжена отрицательно или имеет более высокий pH по сравнению с внешней средой). Взаимное расположение компонентов статора и ротора различно, что и предопределяет различие направлений вращения ротора; в — ротор и статор располагаются как в а, но из-за обратного направления $\Delta\bar{p}H$ ротор вращается в другую сторону; X_1 , X_2 и X_3 — протонакцепторные группы ротора, а Y^- и Z^- — таковые статора. Для простоты указаны только три группы X (в варианте а видны группы X_1 и X_2 , обращенные к наблюдателю, а X_3 не видна, будучи на противоположной стороне ротора). В реальной системе число групп X должно быть гораздо большим

тапливание одноименно заряженных групп ZH^+ и XH^+ , вызывая вращение ротора в другую сторону с состоянием а, когда $\Delta\bar{p}H$ имеет естественное направление. Группа Z не нужна, если принять, что в условиях кислого pH в выходном колодце группа Y^- может принимать два протона, превращаясь в YH^+ .

Возможно, что эффективность утилизации и пороговое значение $\Delta\bar{p}H$ различны при работе мотора в режимах а и в. Поэтому неудивительно, что иногда $\Delta\bar{p}H$ одного направления вызывает вращение флагаеллы, а $\Delta\bar{p}H$ обратного направления не вызывает, как это было в цитированных выше опытах Адлера на «теньях» бактериальных клеток.

Движение протонов по «колодцам» является, по-видимому, чисто физическим процессом, судя по тому факту, что работа мотора не зависит от температуры. Это может быть диффузия ионов H^+ или H_3O^+ по обводненной поре, или их миграция вдоль цепочки молекул связанной воды, либо эстафета по закрепленным в белке протонакцепторным группам, не требующая конформационных изменений белковой молекулы. Перенос протонов между этими группами не лимитирует скорость процесса в целом, о чем свидетельствует неизменность вращательного момента мотора при замене H_2O на D_2O .

Интересен вопрос, не используется ли данный механизм протонного проведения в других H^+ -проводящих путях. На первый взгляд, ответ должен быть отрицательным, так как все прочие известные в настоящее время мембранные преобразователи энергии имеют обычную для ферментов зависимость от температуры, т. е. торможение процесса в 2—3 раза при снижении температуры на 10° . Это верно даже для изолированного фактора F_0 , единственной функцией которого, как принято считать, служит перенос протонов (см. выше раздел 5.1.1.5). Однако не исключено, что температура влияет не на перенос протонов как таковой, а на какое-то конформационное изменение, происходящее, например, на дне протонного «колодца», образуемого фактором F_0 .

5.3.4. $\Delta\bar{p}H$ -зависимая подвижность не содержащих флагаелл прокариот и внутриклеточных органелл

Как показали опыты, поставленные в нашей лаборатории [612, 1407], скользящее движение трихомов многоклеточных цианобактерий *Phormidium uncinatum* по поверхности подложки поддерживается энергией $\Delta\bar{p}H$, а не АТР. Такое заключение было сделано на основании ингибиторного анализа скольжения, когда энергия поставлялась фотоцепью, дыханием или гликолизом. В тех же опытах было продемонстрировано движение трихомов при создании искусственных $\Delta\bar{p}H$ или ΔpH в присутствии ДЦКД, блокировавшего образование АТР за счет $\Delta\bar{p}H$.

Ph. uncinatum не имеют флагаелл. Предполагается, что их движение как-то связано с фибриллами, локализованными под внешней мембраной трихома [669, 670]. Если это действительно так, то фибриллы должны быть соединены с несущей $\Delta\bar{p}H$ цитоплазматической мембраной клеток, образующих трихом.

В литературе можно найти указание на то, что скользящее

движение бактерии *Flexibacter* также поддерживается ΔpH [1254].

В то же время скользящее движение тканевых паразитов животных (микоплазм) и растений (спироплазм), по-видимому, не зависит от ΔpH . У этих бактерий отсутствуют не только флагеллы, но и клеточная стенка, так что они отделены от среды одной только цитоплазматической мембраной. Движение паразитов оказалось устойчивым к протонофору (1 мМ динитрофенолу) [300, 423, 1280]. Скольжение *Spiroplasma* полностью подавлялось ингибиторами гликолиза и ДЦКД [423]. Остается открытым вопрос о движущей силе процесса скольжения. Им мог бы быть либо АТР, либо ΔpH или какой-либо другой ионный градиент.

Интересное наблюдение было опубликовано недавно Уотер-бери и соавт. [1578], изучавшими движение мелких одноклеточных цианобактерий рода *Synechococcus*, обнаруженных в Атлантическом океане. Они плывут сквозь объем жидкости со скоростью порядка $25 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$. По данным световой микроскопии, движение клетки *Synechococcus* напоминает таковое флагеллярных бактерий. Однако электронная микроскопия не обнаружила флагелл. Более того, обработка клеток блендером в течение 15 мин не влияла на их подвижность в условиях, когда 15-секундная обработка флагеллярных *E. coli* или *Vibrio parahaemolyticus* полностью лишала бактерии флагелл и обездвиживала. Авторы пишут, что ими обнаружен новый механизм подвижности, отличающийся от такового как обычных одноклеточных бактерий, имеющих флагеллы, так и многоклеточных цианобактерий, требующих твердую подложку, чтобы ползти по ней.

По-видимому, подобный механизм лежит в основе вращательного движения хлоропластов харовых водорослей. Вращение хлоропластов было открыто в 1838 г. французом Донне, изучавшим капли протоплазмы, выдавленной из клетки водоросли *Chlorella*. Это явление впоследствии было забыто и переоткрыто несколько раз (см. обзор: [771]). Недавно Е. Х. Моценко в нашей группе повторила эксперимент Донне, чтобы выяснить источник энергии для вращения хлоропластов. В опытах использовали нителлу из оз. Байкал. Оказалось, что хлоропласты могут часами вращаться в капле протоплазмы. Скорость вращения колебалась в пределах один оборот за 2—3 с. Иногда направление вращения менялось на противоположное. Период времени, в течение которого направление вращения оставалось неизменным, в отдельных случаях достигал часа. Вращение хлоропластов удалось наблюдать также и в интактных клетках водоросли. В некоторых случаях один или несколько хлоропластов отрывались от их неподвижного мультислоя, расположенного под цитоплазматической мембраной водоросли. Уносимые током цитозоля, они медленно вращались с той же скоростью, что и в выдавленных каплях протоплазмы.

Был проведен ингибиторный анализ вращения хлоропластов.

Для сравнения смотрели действие тех же ингибиторов на циклоз — движение протоплазмы, поддерживаемое энергией АТР. Полученные данные показали, что вращение хлоропластов на свету устойчиво, а в темноте чувствительно к ДЦКД. Включение света немедленно включало вращение хлоропластов, остановленное в темноте посредством ДЦКД. Вращение тормозилось аммонием, рассеивающем ΔpH — главную составляющую ΔpH в хлоропластах. Если концентрация соли аммония была не слишком велика, торможение удавалось преодолеть, повысив интенсивность света. Ингибиторами вращения оказались также разобщители-протонофоры. Цитохалазин В, блокирующий АТР-зависимые движения в клетке, не влиял на вращение хлоропластов, но полностью останавливал циклоз. Все эти соотношения могли быть предсказаны в рамках предположения о том, что вращение хлоропластов поддерживается ΔpH . Как и в описанных выше опытах с *Synechococcus*, электронная микроскопия не позволила выявить каких-либо образований типа флагелл, прикрепленных к оболочке хлоропласта [1407, 1409].

Принимая во внимание вероятное происхождение хлоропластов от цианобактерий, можно предположить, что их вращение поддерживается тем же неизвестным пока механизмом, который лежит в основе движения *Synechococcus*. Поскольку хлоропласты и *Synechococcus* лишены наружных флагелл, приходится думать о каком-либо другом механизме движения. Им могло бы быть волнообразное колебание внешней мембраны клетки или органеллы либо вращение коротких фимбрий или мембранных выростов. Подобный механизм мог бы приводить в движение цитозоль в узких щелях между хлоропластами в мультислое, ускоряя транспорт синтезируемого в них сахара. Именно в этом и состоит, быть может, функция рассматриваемого механизма. Циклоз также призван выполнять эту функцию, но его роль ограничивается свободным пространством цитоплазмы, находящимся между мультислоем хлоропластов и тонопластом.

Механизм превращения энергии в хлоропластах по типу $\Delta\text{pH} \rightarrow$ механическая работа требует, конечно, дальнейших исследований. Однако уже сегодня этот аспект важен в том отношении, что он призван привлечь внимание к такого рода процессам в живых системах, иных, чем бактерии.

В работе Берайтер-Хана и Фурмана [243] были получены некоторые указания на ΔpH -зависимое движение митохондрий животной клетки. Авторы исследовали локомоцию митохондрий в клетке. Скорость перемещения митохондрий (около $5 \text{ мкм} \cdot \text{мин}^{-1}$) была на несколько порядков ниже скорости движения бактерий (до $140 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$). Ингибиторный анализ движения митохондрий внутри клетки позволил заключить, что этот процесс представляет собой «собственную активность органелл, зависящую от переноса электронов, а не от окислительного фосфорилирования» [243].

Локомоция митохондрий, по-видимому, представляет собой следствие обратимых периодических изменений их объема, что позволяет органеллам ползти сквозь цитоплазму, двигаясь наподобие дождевого червя. Движение зависит от целостности цитоскелета, определяющего направление движения. Остается неясным отношение этого механизма к АТР-зависимому движению внутриклеточных частиц под действием кинезина или белка MAP-1C — особых механо-АТРаз, связанных с микротрубочками.

5.3.5. Подвижные симбионты эукариот и прокариот

Обзор $\Delta\bar{p}H$ -зависимой подвижности был бы неполным без упоминания редких, но весьма впечатляющих случаев, когда неподвижная эукариотическая клетка использует подвижные бактериисимбионты для целей локомоции. Так движется, в частности, *Mixotricha paradoxa*, крупное простейшее из класса флагеллат, обнаруженное в кишечнике термита. Как показали Кливленд и Гримстоун [390], движение простейшего обеспечивается координированным волнообразным движением мембран многих тысяч спирохет, покрывающих большую часть тела миксотрихи. Интересно, что миксотриха имеет четыре собственных флагаеллы, которые, однако, она использует не для движения, а для какой-то иной, пока неизвестной цели, может быть, в качестве водителя ритма, синхронизирующего работу спирохет. Такая синхронизация могла бы, например, производиться прикосновением флагаеллы к спирохете, вызывающим (через систему восприятия тактильных сигналов) реверсию ее протонных моторов. (Образно говоря, миксотриха погоняет своих спирохет флагаеллой как бичом, — красивое, но пока бездоказательное предположение.)

Еще один пример подобного рода был описан Таммом [1488], изучавшим другой вид простейшего — девесковиниду, также относящуюся к флагаеллатам и обитающую в кишечнике термитов. Как и *Mixotricha paradoxa*, девесковинида использует для движения не собственные флагаеллы, а бактериисимбионты. На поверхности простейшего в специальных выемках, образуемых мембраной хозяина, располагаются тысячи палочковидных перитрихальных бактерий (рис. 93, а). Все флагаеллы этих бактерий локализованы на той части бактериальной клетки, которая обращена во внешнюю среду. Вращение флагаелл хозяина удается выключить амфотерицином В или нистатином, для действия которых необходим холестерин, имеющийся у простейшего, но отсутствующий у бактерий. Жгутики бактерий продолжают вращаться в присутствии этих антибиотиков, что обеспечивает подвижность простейшего, несмотря на неподвижность его собственных флагаелл. В то же время разобщители-протонофоры, шунтирующие мембрану бактерий, парализуют девесковиниду. Субклеточные пузырьки, полученные

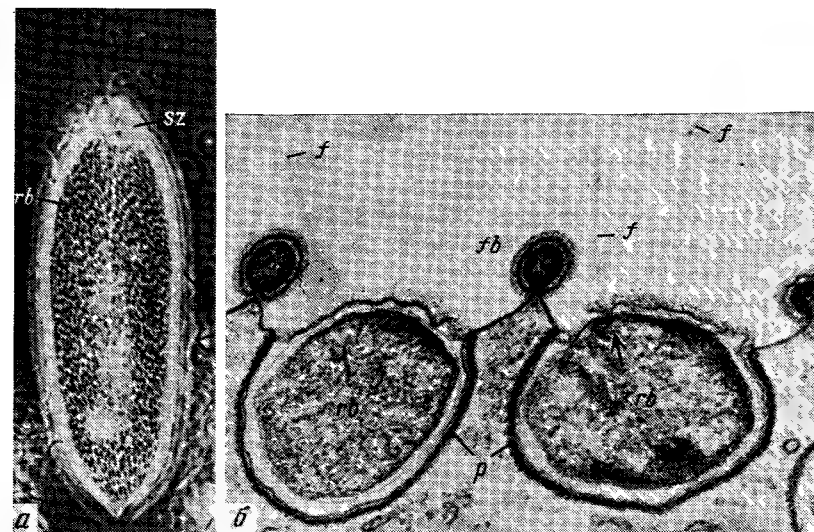


Рис. 93. Бактерии-эктосимбионты, обеспечивающие подвижность девесковиниды — простейшего из класса флагаеллат

а — одиночная клетка девесковиниды. На ее поверхности — палочковидные бактерии (rb). Между «головной частью» и «телом» девесковиниды видна зона без бактерий (sz). Отрезок равен 10 мкм;

б — срез через ряды палочковидных бактерий (rb) и веретенообразных бактерий (fb) на поверхности «тела» девесковиниды. Палочковидные бактерии располагаются в особых выемках (р), образованных мембраной клетки-хозяина. Каждая палочковидная бактерия несет флагаеллы (f). Веретенообразные бактерии прикреплены к складкам на поверхности девесковиниды. Увеличение 96 000 (по: Тамм [1488])

из клеток девесковиниды, вращаются со скоростью, пропорциональной числу бактерий, сохранившихся на их поверхности.

Как видно на рис. 93, б, девесковинида несет на своей поверхности, помимо палочковидных бактерий, также и какие-то другие бактерии, имеющие веретенообразную форму. Тамм полагает, что эти последние играют чисто структурную роль «направляющих», вдоль которых ориентируются пучки флагаелл палочковидных бактерий [1488].

Как *Mixotricha paradoxa*, так и девесковинида совершает активное скользящее движение по поверхности подложки. Скорость скольжения достигает $150 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$, что намного превосходит скорость скольжения прокариот, например цианобактерий (порядка $10 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$). Складывается впечатление, что локомоторная система этих простейших — весьма эффективный способ движения.

Размер клетки *M. paradoxa* — порядка 0,1 мм, а девесковиниды — 0,5 мм. Есть подвижные цианобактерии, трихомы которых достигают длины около 1 мм.

Не описано случаев, чтобы $\Delta\bar{p}H$ использовалась для движения

организмов большей длины. Более крупные живые объекты, чтобы двигаться, всегда применяют АТРазные системы актомиозинового типа.

Трудно представить себе устройство, в котором бактериальная флагелла длиной около 20 нм нашла бы себе применение, чтобы перемещать в пространстве организм, построенный из множества крупных эукариотических клеток. Однако изучая актомиозиновый механизм, конечно, важнейший для животных и нас самих, мы должны иметь в виду, что миниатюрные формы жизни выбрали совсем другой способ быть подвижными. С этой целью они используют вращающийся диск, так что изобретение колеса не следует приписывать человеку. Диск — элемент более сложной конструкции, базального тела, служащего молекулярным прототипом нашего электромотора, опять-таки, оказывается, изобретенного задолго до нас. Ось мотора соединена с жестким филаментом, играющим роль винта моторной лодки.

Такой или несколько видоизмененный механизм применяется не только, чтобы плыть, но и чтобы скользить по поверхности, как движутся трихомы цианобактерий и некоторые простейшие. Последние даже вступили с этой целью в эктосимбиоз с бактериями, пытаясь как бы построить океанский лайнер из моторных лодок. Неудивительно, что такая попытка оказалась эволюционным тупиком.

5.4. $\Delta\bar{p}H$ как источник энергии для образования тепла

5.4.1. Три способа превращения метаболической энергии в тепло

В живой клетке тепло может выделяться тремя основными способами: 1) при гидролизе АТР, 2) при рассеянии $\Delta\bar{p}H$ и 3) при окислении субстратов системами, не образующими ни АТР, ни $\Delta\bar{p}H$. В механизмах первого типа участвует дыхание, сопряженное с фосфорилированием, в то время как в случаях 2 и 3 дыхание соответственно разобщенное или первично не сопряженное с запасением энергии. Чтобы отличить последние два механизма от систем первого типа, где путь от субстрата дыхания к теплу весьма сложен и требует образования и утилизации АТР, удобно использовать понятие «свободное окисление», объединяющее как разобщенные, так и первично не сопряженные дыхательные системы.

Изучение регуляторной теплопродукции у теплокровных животных показало, что все три упомянутые выше механизма могут активироваться в ответ на понижение окружающей температуры. Тот факт, что дыхательные системы как-то вовлечены в терморегуляцию, был выяснен в ранних физиологических исследованиях, показавших сильное увеличение поглощения кислорода млеко-

питающими и птицами, помещенными в холодные условия. Обычно такое усиление дыхания, достигающее 2,5 раз, происходит без пропорционального увеличения основных функций организма. Создалось впечатление, что физиологические функции на холоде осуществляются менее эффективно: чтобы совершить одну и ту же работу, в холодных условиях необходимо потребить больше пищи и кислорода, а значит, выделить больше тепла. Возможно и другое объяснение данного эффекта: при охлаждении эффективность функций как таковых остается неизменной, а возросшие дыхание и теплопродукция обусловлены активацией каких-то специализированных механизмов образования тепла. Второе объяснение выглядит более рациональным, поскольку оно соответствует задаче, решаемой терморегуляторной системой организма, — сделать физиологические функции независимыми от температуры окружающей среды.

Существует две экспериментальные модели для изучения терморегуляции, а именно ответ на внезапное понижение окружающей температуры и длительная адаптация к холоду. Ниже мы рассмотрим обе эти модели.

5.4.2. Терморегуляторная активация свободного дыхания у животных

5.4.2.1. Скелетные мышцы

Работы по действию кратковременного охлаждения животного на митохондрии были начаты в 1960 г. нами совместно с С. П. Масловым в лаборатории С. Е. Северина. Опыты ставили на голубях, которых предварительно остригали, чтобы исключить физическую терморегуляцию. Клетку с животным помещали в холодильник при -20° и включали вентилятор. Голубь, впервые помещенный в эти жестокие условия, выживал в течение 15–20 мин, после чего наступало резкое снижение температуры тела. Однако при повторном охлаждении, которому подвергали голубя на следующий день, животное лишь несколько снижало температуру своего тела, после чего она стабилизировалась и голубь мог выдерживать охлаждение часами.

Изучение митохондрий, выделенных из грудной мышцы голубя, охлаждавшегося впервые, показало снижение коэффициента Р/О в 1,6 раза по сравнению с неохлаждавшимися животными. Второе охлаждение вызывало снижение Р/О в 6 раз, т. е. наступало почти полное разобщение дыхания и фосфорилирования [124, 135, 1393].

Дальнейшее исследование этого эффекта показало, что степень разобщения достигает максимума уже через 15 мин после помещения животного на холод. Разобщение в мышечных митохондриях могло быть продемонстрировано не только у птиц, но и у млекопитающих, а именно у мышей [136].

Следующая проблема состояла в том, происходит ли разобщение *in vivo* или оно есть следствие повреждения митохондрий при выделении и инкубации. По сути дела, этот ключевой вопрос всегда возникает, когда в опытах на митохондриях *in vitro* пытаются проследить влияние факторов, действовавших *in vivo*. Ниже мы рассмотрим, как была решена подобная проблема применительно к холодовому разобщению в мышцах, поскольку впервые это удалось сделать как раз на данной модели.

Один из использованных подходов состоял в измерении концентрации метаболитов непосредственно в мышечной ткани. Оказалось, что концентрация высокоэнергетических соединений возрастает при первом охлаждении и падает при втором [136]. Этот факт свидетельствовал по меньшей мере о том, что мышцы как-то вовлечены в исследуемый терморегуляторный ответ. Измерение дыхания *in vivo* выявило его стимуляцию как при первом, так и при повторном охлаждении животного. В первом случае стимуляция сменялась прогрессирующим торможением дыхания, в то время как во втором торможения не наступало [135]. Именно таких соотношений можно было ожидать, если животное, охлаждаясь впервые, не успевало в должной степени разобщить дыхание от фосфорилирования и избыточное потребление кислорода приводило к избыточному синтезу ATP и торможению дыхательной цепи по механизму протонного контроля. При втором действии холода происходило сильное разобщение, предотвращавшее накопление ATP и истощение ADP, так что состояние дыхательного контроля не наступало. Но если эта логика верна, то введение животному искусственного разобщителя-протонофора при первом охлаждении могло бы спасти организм от скоростной смерти от холода. Опыты, поставленные С. П. Масловым, подтвердили это предсказание. Инъекция 2,4-динитрофенола, который вообще-то ядовит для животных, значительно увеличивала продолжительность жизни на холоде мышей, впервые подвергнутых охлаждению [136].

Другой подход состоял в изучении *in vitro* систем, иных, чем изолированные митохондрии. Как показала Е. А. Мишукова [78], повторное охлаждение снижает пастеровский эффект в мышечных гомогенатах. Это наблюдение также было предсказано гипотезой о терморегуляторном разобщении в мышце: разобщенное дыхание уже не может конкурировать с гликолизом за ADP и фосфат. В других опытах Е. Н. Моховой и Д. Б. Зоровым [66, 94] было показано, что дыхание интактной мышцы диафрагмы крысы активируется при повторном охлаждении животных. Одновременно снижается степень стимуляции дыхания ткани динитрофенолом. Эффект, подобный охлаждению, мог быть вызван инъекцией животному норадреналина.

Дальнейшие опыты показали, что концентрация жирных кислот значительно возрастает в мышцах животных, подвергнутых

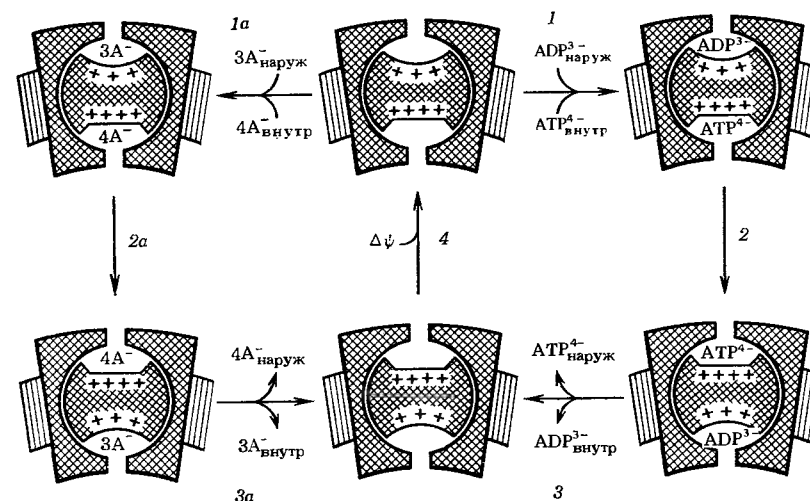


Рис. 94. Возможный механизм разобщения при участии ATP/ADP-антипортера

Предполагается, что наряду с обменом ATP^{4-}/ADP^{3-} [реакции 1—4] антипортер может облегчать трансмембранное электрофоретическое перемещение анионов жирных кислот (A^-). Этот второй процесс происходит таким образом, что один оборот антипортера приводит к переносу одного A^- из матрикса в межмембранное пространство митохондрии [реакции 1а, 2а, 3а и 4]. Предполагается, что $A^-_{\text{наруж}}$ соединяется с H^+ и диффундирует обратно в матрикс в форме AH , для которой мембрана проницаема. Диффузия AH , которая может происходить независимо от антипортера, на рисунке не показана

повторному воздействию холода [78]. Было получено несколько независимых свидетельств роли свободных жирных кислот в качестве медиаторов терморегуляторного разобщения в мышцах.

1. Связывание жирных кислот при промывании митохондрий раствором предварительно обезжиренного сывороточного альбумина повышало коэффициент Р/О в митохондриях из мышц охлажденных животных [78].

2. Фракция жирных кислот, выделенная из мышц охлажденных животных и добавленная к митохондриям контрольных животных, вызывала разобщение [78].

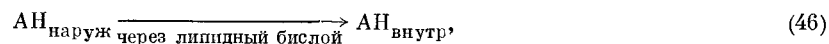
3. Е. Н. Моховой и ее коллегами в нашей группе было обнаружено, что пальмитиновая кислота в концентрации всего $1 \cdot 10^{-5}$ М заметно стимулирует дыхание мышечных митохондрий в состоянии дыхательного контроля, причем этот эффект подавляется $5 \cdot 10^{-7}$ М карбоксиатрактолизидом, специфическим ингибитором ATP/ADP-антипортера (см. раздел 5.2.7.2) [5]. ADP, добавленный как с олигомицином, так и без него, также подавлял стимуляцию дыхания малыми дозами пальмитата [5].

Возможный механизм разобщения жирными кислотами, опосредованного участием ATP/ADP-антипортера, показан на рис. 94.

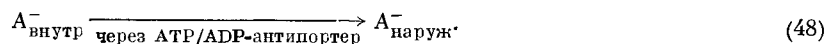
Предполагается, что антипортер состоит, во-первых, из «статора», несущего «ворота» для нуклеотидов, блокирующиеся карбоксиатрактилозидом со стороны межмембранного пространства и бонгкрековой кислотой со стороны матрикса, и, во-вторых, «ротора», ответственного за обмен ATP^{4-} на ADP^{3-} . Анионы жирных кислот (A^-) достигают, минуя «ворота», нуклеотидсвязывающих центров, скажем, NH_3^+ -групп лизиновых остатков антипортера [1554]. Затем анионы A^- переносятся через мембрану ротором, вращающимся под действием $\Delta\psi$. Облегчение трансмембранного перемещения анионов A^- может иметь принципиальное значение для разобщающего действия жирных кислот, поскольку их анионные формы задерживаются на поверхности раздела мембрана/вода, ориентируясь карбоксилем в сторону воды, а жирным «хвостом» — в сторону липида. Именно поэтому мембраны плохо проницаемы для анионов жирных кислот и хорошо проницаемы для их нейтральных (протонированных) форм (АН), так же как для уксусной кислоты и т. п. Если ATP/ADP -антипортер может переносить A^- , это обстоятельство должно повысить эффективность жирных кислот как разобщителей.

В хорошем соответствии с этой логикой находятся наблюдения Т. В. Выгодиной и Л. М. Цофиной, показавших, что пальмитат не способен ни повышать протонную проводимость плоских фосфолипидных мембран, ни тормозить генерацию $\Delta\psi$ в цитохромоксидазных протеолипосомах. В тех же условиях грамицидин и ХКФ снимали дыхательный контроль и тормозили образование $\Delta\psi$ как в митохондриях, так и в протеолипосомах, причем этот эффект оказался устойчивым к карбоксиатрактилозиду. Что касается динитрофенола, карбоксиатрактилозид частично тормозил действие его низких концентраций на митохондрии. Последнее легко объяснить участием ATP/ADP -антипортера в переносе анионов динитрофенола ($\text{pK} = 4$).

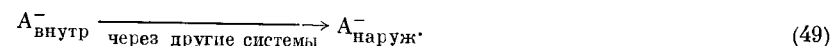
Наши опыты показали, что разобщающее действие больших концентраций пальмитата уже не удается снять карбоксиатрактилозидом. Можно думать, что какие-то другие системы вступают в игру при повышении концентрации жирной кислоты. Согласно нашей схеме, разобщение низкими и высокими концентрациями жирных кислот можно описать соответственно уравнениями (45) — (48) и (45)—(47), (49):



При низкой $[\text{A}^-]$:



При высокой $[\text{A}^-]$:



Следует подчеркнуть, что схема с вращающимся ротором, показанная на рис. 94, — это лишь одна из возможностей антипортного механизма. Альтернативная возможность — трансмембранная эстафета ATP и ADP по цепочке нуклеотидсвязывающих мест. В таком случае можно предположить обратимое связывание анионов жирных кислот с катионными лигандами этих мест, что должно облегчить перемещение A^- через мембрану.

Разобщение жирными кислотами было впервые описано Пресмэнном и Ларди еще в 1956 г. [1211]. Значительно позднее выяснилось, что жирная кислота [1616, 1617] и жирный ацил- CoA [1161] тормозят ATP/ADP -антипорт. Бонгкрековая кислота, мощный ингибитор ATP/ADP -антипортера, представляет собой ненасыщенную жирную кислоту с тремя карбоксильными группами. Две из них расположены на расстоянии 0,55 нм, равном таковому между ионизованным кислородами соседних фосфорильных остатков в ADP и ATP . В карбоксиатрактилозиде также есть две соседние карбоксильные группы, расстояние между которыми 0,55 нм. По схеме на рис. 94 соседние карбоксилы бонгкрековой кислоты и карбоксиатрактилозида связываются с двумя катионными лигандами «роторной» части антипортера.

То обстоятельство, что жирные кислоты не только повышают H^+ , но и конкурируют с адениннуклеотидами за ATP/ADP -антипортер, должно страховать клетку от истощения фонда внемитохондриального ATP в условиях разобщения, когда $\text{H}^+ - \text{ATP}$ -синтаза начинает действовать в обратном (гидролитическом) направлении. Истощение ATP , помимо всего прочего, могло бы блокировать окисление жирных кислот, служащих не только регулятором сопряжения, но и основным субстратом дыхания на холоде [1432, 1433]. Активация жирных кислот путем их соединения с CoA за счет энергии ATP происходит, как отмечалось в разделе 5.2.8.1, во внешней мембране митохондрий.

Указание на способность ATP/ADP -антипортера повышать протонную проводимость мембраны митохондрий было получено А. В. Пановым и соавт. [1164]. ADP частично предотвращал этот эффект. В этой связи следует отметить, что термогенин, белок, специализированный на трансмембранном проведении протонов в митохондриях бурого жира, во многом подобен по аминокислотной последовательности и доменному строению ATP/ADP -антипортеру [176, 288]. Перенос H^+ термогенином также активируется жирными кислотами и тормозится пуриновыми нуклеотидами (см. следующий раздел). Поэтому можно полагать, что как в мышцах, так и в буром жире жирные кислоты служат медиаторами терморегуляторного разобщения в митохондриях, однако в первом слу-

чае мишенью жирных кислот оказывается АТР/АДР-антипортер, а во втором — специальный белок, представляющий собой, по-видимому, особую модификацию антипортера.

Другая весьма важная характеристика разобщения жирными кислотами состоит в том, что здесь не требуется специального механизма для прекращения разобщающего эффекта. Разобщение исчезнет само по себе, как только скорость поступления жирных кислот в митохондрии станет меньше скорости их окисления. Именно такие соотношения возникают при повышении окружающей температуры, когда отключаются холодовые рецепторы кожи, а с ними прекращается действие регуляторного каскада, обеспечивающего образование жирных кислот из триглицеридов (см.: [1108, 1432, 1433] и следующий раздел). С прекращением подачи жирных кислот в митохондрию их запас быстро исчерпывается мощной системой β -окисления. В итоге уровень жирных кислот падает, и разобщение, вызванное жирными кислотами, исчезает.

Таким образом, то обстоятельство, что жирные кислоты служат одновременно и субстратом окисления, и регулятором этого процесса, автоматически предотвращает ситуацию, когда окисление разобщается от фосфорилирования на более длительный срок, чем это необходимо для терморегуляции. Данное свойство системы может иметь большое значение, поскольку дыхание разобщенное — термодинамически более выгодный процесс, чем сопряженное. Поэтому возврат от разобщенного состояния к сопряженному мог бы, в принципе, быть связан с известными трудностями.

Явления, описанные выше, характерны для ответа мышц на повторное охлаждение. Однако в мышцах существует и другой термогенный механизм, включающийся уже при первом воздействии холода. Это — мышечная дрожь, поддерживаемая, как любое сокращение мышц, гидролизом цитоплазматического АТР. Регенерация последнего происходит за счет транспорта АТР из митохондрий АТР/АДР-антипортером. В митохондриях АТР образуется H^+ —АТР-синтазой, которая потребляет ΔpH , генерируемую дыхательной цепью. По-видимому, такой путь — слишком длинный и медленный, чтобы резко увеличить продукцию тепла в условиях внезапного понижения температуры среды. Кроме того, он связан с сильной активацией мышечного сокращения, т. е. специфической функции данной ткани (потребление кислорода организмом при резком охлаждении приближается к таковому при тяжелой мышечной работе). В результате главный принцип терморегуляции — сделать функции независимыми от температуры — в данном случае остается нереализованным применительно к самой массовой ткани организма — мышечной. Вот почему мышечная дрожь уменьшается по мере адаптации к холоду. Снижение дрожи коррелирует с возрастанием способности норадреналина активировать тканевое дыхание [460, 724, 768, 1108, 1432, 1433]. Как будет показано в следующем разделе, имен-

но норадреналин служит медиатором в активации липолиза, а следовательно, и терморегуляторного разобщения.

Мышцы продолжают участвовать в дополнительной продукции тепла на холоду при повторных охлаждениях, когда дрожь резко уменьшается. Об этом свидетельствуют материалы, приведенные выше, а также тот факт, что эффективность мышечной работы снижается при адаптации к холоду [10]. Последнее легко объяснить разобщением, обусловленным жирными кислотами.

Все данные, касающиеся терморегуляторного разобщения в мышцах, были получены в лабораторных опытах на голубях, мышах и крысах. Позднее этот феномен был воспроизведен Гравом и Бликсом [638] на северных морских котиках в природных условиях. По данным этих авторов, митохондрии скелетных мышц северных морских котиков, живущих в холодном океане, имеют резко сниженный дыхательный контроль по сравнению с котиками, адаптированными к теплу. Снижение дыхательного контроля исчезает при промывании митохондрий обезжиренным сывороточным альбумином.

Согласно Барре и соавт. [224], митохондрии скелетных мышц утят, адаптированных к 4° в течение нескольких недель, имеют вдвое более высокую скорость дыхания в присутствии добавленного разобщителя (расчет на 1 мг митохондриального белка), чем митохондрии утят, выдерживавшихся при 25° . В печени подобный эффект отсутствовал. К сожалению, авторы выделяли и инкубировали мышечные митохондрии с сывороточным альбумином, что, по-видимому, сделало невозможным выявление каких-либо изменений в степени сопряжения дыхания и фосфорилирования.

Дальнейшие исследования показали, что мышцы не уникальны в метаболическом ответе на охлаждение. В нем участвуют также по крайней мере еще две ткани — бурый жир и печень.

5.4.2.2. Бурый жир

Многие черты терморегуляторного разобщения жирными кислотами, впервые описанного в митохондриях скелетных мышц, были затем прослежены применительно к митохондриям бурого жира, особой ткани млекопитающих, специализированной на выработке добавочного тепла при снижении окружающей температуры.

Бурый жир составляет не более 1—2% веса тела. Тем не менее стимуляция этой ткани симпатической нервной системой при охлаждении животных, предварительно адаптированных к холоду, повышает его теплопродукцию в такой степени, что она может достигать трети всего образованного в организме тепла [575]. В этих условиях бурый жир способен выделять до 400 Вт тепла на 1 кг веса, что на несколько порядков больше обычной термо-

генной способности тканей млекопитающих (человек в состоянии покоя образует около 1 Вт тепла на кг веса) [1093].

Бурый жир находится в верхней части спины, ближе к шее. Он окружает кровеносные сосуды, питающие кровью мозг. Вот почему теплопродукция в буром жире может иметь огромное значение для выживания организма на холоде.

Первые научные публикации о буром жире датируются XVII в., но лишь недавно была понята его функция. В 1959 г. Йоханссон [778] написал первый подробный обзор о метаболизме бурого жира. Основываясь на скудной фактической информации тех лет и некоторых предварительных данных, он выдвинул гипотезу, что бурый жир может каким-то образом участвовать в терморегуляции. Благодаря последующим работам Смита и ряда других исследователей стало ясно, что основной физиологической функцией бурого жира является образование дополнительного тепла в условиях, когда возрастает теплоотдача организма [153, 509, 1107, 1108, 1093, 1249, 1432, 1433].

Своим цветом бурый жир обязан митохондриям, содержащимся в огромных количествах в клетках этой ткани [568, 943]. Митохондрии бурого жира оказались хорошо оснащенными для образования тепла. Содержание дыхательных ферментов в них намного превышает таковое H^+ —АТФ-синтазы. Но, пожалуй, важнее всего то, что в их внутренней мембране содержится термогенин — особый белок-протонофор (его существование было предсказано в 1976 г. Никольсом [1105]). Термогенин составляет до 10—15% общего белка митохондрий бурого жира [1108].

Молекулярная масса термогенина равна 33,2 кДа. Его ДНК была клонирована в *E.coli* [287]. Недавно удалось выяснить аминокислотную последовательность термогенинов из хомяка (рис. 95) и крысы [288]. Как уже отмечалось в предыдущем разделе, последовательность термогенина напоминает последовательность АТФ/АДФ-антипортера. Подобно антипортеру, термогенин синтезируется, минуя стадию более крупного предшественника [1253]. Как и в случае АТФ/АДФ-антипортера мышечных митохондрий, микромолярные концентрации жирных кислот каким-то образом активируют протонофорную функцию термогенина, что и приводит к разобщению. Пуриновые нуклеотиды снижают протонное проведение, вызванное жирными кислотами [508, 1104, 1108]. Недавно оба эти свойства термогенина были воспроизведены на протеолипосомах [286, 858, 1463]. ДЦКД, связывающийся с термогенином [870], к сожалению, не был изучен на уровне протеолипосом в отношении его возможного действия на протонное проведение.

Привлекательная возможность состоит в том, что термогенин представляет собой монофункциональный вариант АТФ/АДФ-антипортера, утратившего основную (нуклеотидтранспортирующую) функцию и специализированного на дополнительной функции —

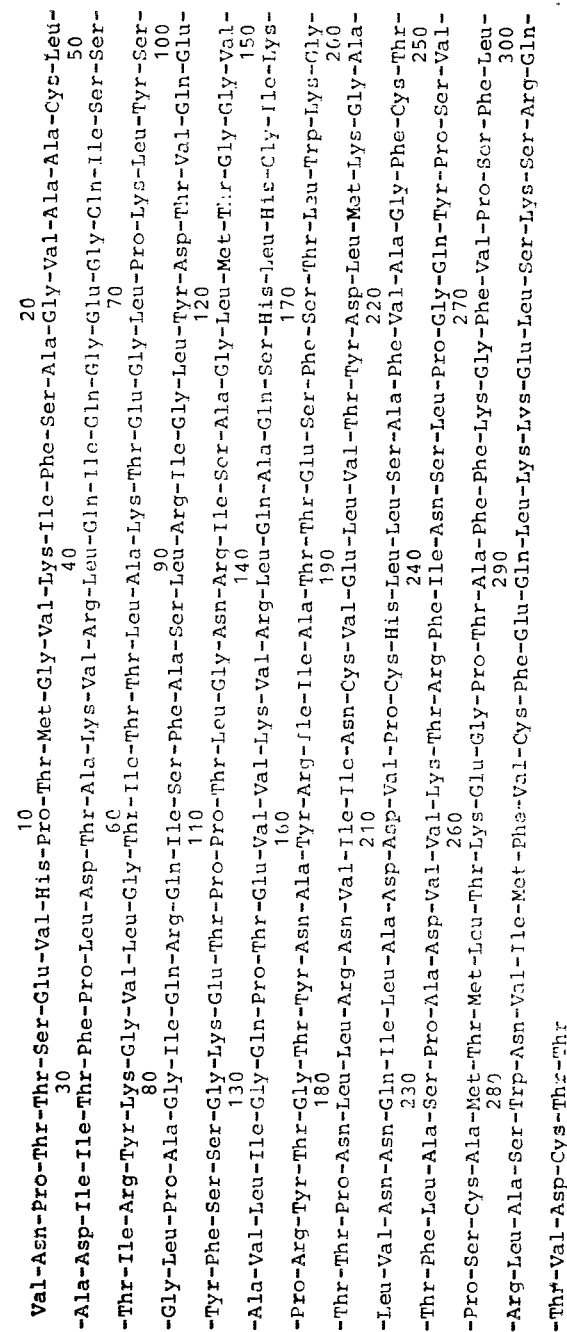


Рис. 95. Аминокислотная последовательность термогенина из митохондрий бурого жира хомяка (по: Аквила и соавт. [176])

разобщении жирными кислотами. В рамках нашей гипотезы, представленной на рис. 94, термогенин облегчает трансмембранный перенос анионов жирных кислот [реакции (1a)–(3a) и (4)], будучи не способным катализировать реакции (1)–(3).

Интересно, что митохондрии бурого жира [877, 1108, 1109] и термогениновые протеолипосомы [1463] имеют высокую проницаемость для ионов Cl^- . Транспорт Cl^- не требует жирных кислот. Он блокируется пуриновыми нуклеотидами. Все эти эффекты объясняются схемой на рис. 94, если предположить, что Cl^- способен, подобно анионам жирных кислот, но в гораздо более высоких концентрациях достигать катионных лигандов термогенина и переноситься им через мембрану.

Ряд исследований был посвящен выяснению роли термогенина в холодовой адаптации. Было найдено, что процесс адаптации сопровождается повышением концентрации термогениновой информационной РНК в цитоплазме [1253] и количества этого белка в митохондриях бурого жира [1108].

Работы на животном *in vivo*, ткани бурого жира *in situ*, адипоцитах и изолированных митохондриях позволили выявить следующую цепь событий, включенных в термогенный ответ этой ткани на понижение температуры среды.

1. Холодовые рецепторы кожи активируются и посылают сигнал в мозг; в терморегуляторный центр гипоталамуса.

2. Из гипоталамуса сигнал поступает в бурую жировую ткань через симпатические нейроны. Из нервных окончаний в пространство между адипоцитами выделяется норадреналин.

3. Норадреналин связывается с β -адренорецепторами, локализованными на внешней стороне плазматической мембраны клеток бурого жира (это и все дальнейшие события иллюстрируются рис. 96).

4. β -Адренорецепторы, связав норадреналин, активируют аденилатциклазу. Синергистом норадреналина служит глюкагон, а антагонистом — инсулин. Каждый гормон действует через свой рецептор.

5. Аденилатциклаза образует cAMP из АТФ.

6. cAMP включает протеинкиназный каскад, приводящий к активации липазы.

7. Липаза расщепляет триглицериды, содержащиеся в жировых каплях, до жирных кислот и глицерина.

8. Образованные таким путем жирные кислоты выполняют две функции: они служат субстратами дыхания и одновременно вторичными (внутриклеточными) медиаторами гормонального сигнала. Как субстраты, жирные кислоты претерпевают обычный цикл катаболических превращений. Они активируются во внешней мембране митохондрии, давая ацил- CoA . Полученные жирные ацилы транспортируются в митохондриальный матрикс посредством карнитиновой системы, где расщепляются, давая CO_2 и вос-

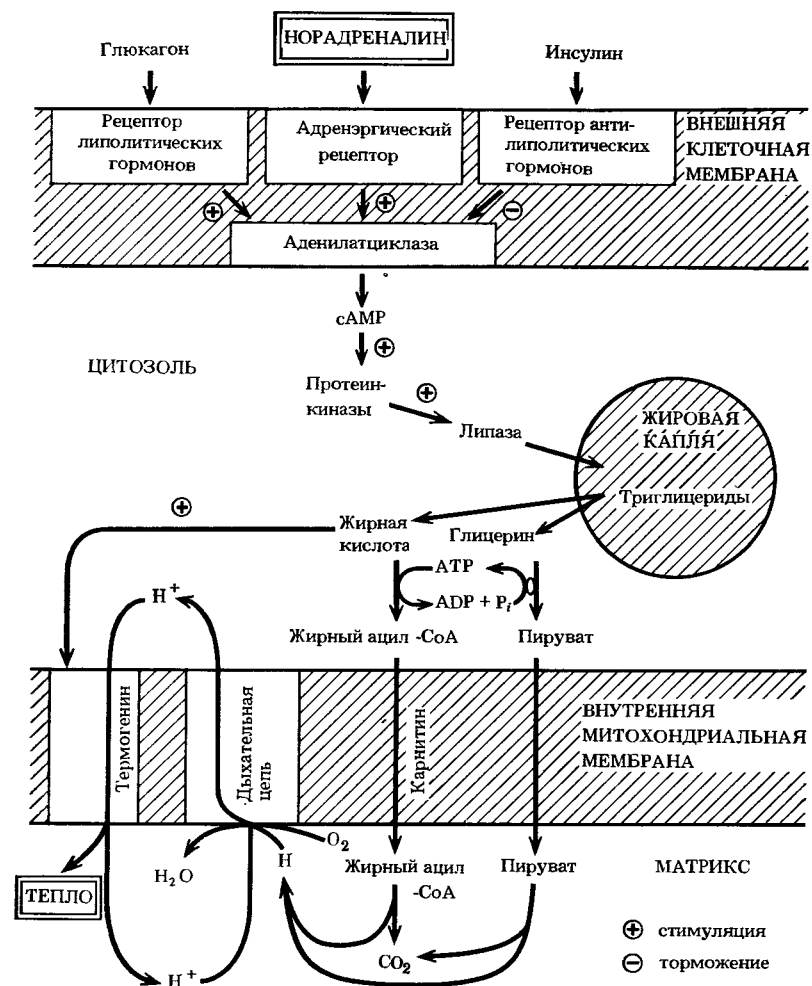


Рис. 96. Индуцированный холодом термогенез в митохондриях бурого жира
Объяснения в тексте

становительные эквиваленты, под действием ферментов β -окисления.

9. Глицерин, другой продукт расщепления триглицеридов, превращается в пируват системой гликолиза, давая моль АТФ на моль глицерина, а значит, и на моль триглицерида. Этой энергии достаточно для активации одного из трех молей жирных кислот, образованных из моля триглицерида. Еще два моля АТФ поставляются при гликолитическом расщеплении углеводов либо

при субстратном фосфорилировании, сопряженном с окислением ацетил- CoA и пирувата в митохондриях.

10. Восстановительные эквиваленты, поставляемые в дыхательную цепь при β -окислении жирных кислот, окислительном декарбоксилировании пирувата и окислении ацетильных групп в цикле Кребса, переносятся к O_2 , что сопряжено с образованием протонного потенциала дыхательными $\Delta\bar{P}H$ -генераторами. В результате ионы водорода откачиваются из матрикса в межмембранное пространство.

11. Ионы H^+ возвращаются в матрикс системой термогенин-жирные кислоты. Этот завершающий этап сопровождается выделением тепла.

Практически все 11 этапов продемонстрированы прямыми экспериментами. В данном контексте наиболее важными представляются наблюдения, показавшие, что эффект охлаждения организма удастся воспроизвести:

а) *in vivo* введением животному норадреналина, а также добавкой названного гормона к адиноцитам или гомогенату бурой жировой ткани, но не к изолированным митохондриям;

б) добавлением проникающего производного $sAMP$ (дибутрил- $sAMP$) к клеткам или гомогенату, но не к митохондриям;

в) добавлением пальмитиновой кислоты к клеткам, гомогенату или митохондриям (см. обзоры: [330, 1093, 1108, 1433]).

Интересно, что не только охлаждение, но по крайней мере еще два состояния организма, связанные с повышением поглощения кислорода и выделения тепла, сопровождаются разобщением в бурой жировой ткани. Одно из таких состояний — пробуждение животного от зимней спячки. Показано, что бурый жир не атрофируется у зимоспящих животных, адаптированных к термонеutralным условиям. Холодовая акклиматизация повышает количество термогенина в митохондриях бурого жира зимоспящих животных, но не в такой степени, как, например, у крыс или кроликов. Пробуждение хомяков от спячки сопровождается разобщением, которое, по-видимому, особенно важно для разогрева крови, притекающей к мозгу. Из-за локализации бурого жира в области сосудов, идущих к голове, теплопродукция в этой ткани прежде всего вызывает повышение температуры мозга, который переходит в активное состояние сразу же вслед за разогревом бурого жира (см. обзоры: [1433, 942, 1108]).

Другая модель — термогенез, обусловленный избыточным потреблением пищи. Ротуэл и Сток [1272] поставили следующий опыт. Взрослым крысам скармливали «ресторанную диету», т. е. разнообразную и вкусную пищу. Потребление животными этой пищи оказалось на 80% больше, чем в контрольной группе, получавшей обычный корм. При этом вес животных за 3 нед. увеличился только на 27%. Измерение газообмена показало, что хорошо питавшиеся крысы потребляли на 25% больше кислорода,

чем в контроле. Эта надбавка исчезала после введения животным пропанола — антагониста норадреналина. Вес бурого жира за те же 3 нед. опыта увеличивался более чем втрое [726, 1273]. В митохондриях возрастало количество термогенина. Подобно адаптации к холоду, «ресторанная диета» сенсibilizировала организм к норадреналину. Инъекция гормона вызывала резкое увеличение потребления кислорода организмом [1272] и повышение количества термогенина в митохондриях бурого жира [726, 1094, 1272]. В то же время мутация, вызывающая ожирение, как оказалось, сопровождается снижением уровня термогенина у мышей [725] (см. обзор: [1108]).

Согласно данным Никольса [415], митохондрии периферической ткани бурого жира людей в юношеском возрасте находятся по степени разобщения в промежуточном положении между митохондриями той же ткани тепло- и холодадаптированных морских свинок. Как и у животных, митохондрии бурого жира людей чувствительны к низким концентрациям жирных кислот.

В заключение этого раздела мы хотели бы подчеркнуть, что термогенная функция дыхания сейчас изучена лучше всего применительно к бурому жиру. Это обстоятельство иногда приводит к переоценке биохимическими значениями данной ткани в терморегуляции. Бытует мнение, что бурый жир — единственная ткань, ответственная за дополнительную теплопродукцию при охлаждении. Известно, однако, что стимуляция дыхания млекопитающих на холоду может быть обусловлена лишь не более чем на 30—40% активацией метаболизма в их буром жире [575]. Что касается птиц, то они вовсе не имеют бурого жира и тем не менее демонстрируют несократительный термогенез и мощное повышение газообмена в ответ на снижение окружающей температуры [123, 135, 223]. Кроме того, как подчеркивают Рафаэл и соавт. [1231], бурый жир играет малую роль в несократительном термогенезе млекопитающих (крыс, хомяков), адаптированных к термонеutralным условиям. С. П. Маслов и соавт. [67] указывают, что хирургическое удаление бурого жира не исключает стимуляции *in vivo* норадреналином или охлаждением дыхания адаптированных к холоду взрослых мышей либо новорожденных крысят.

Перечисленные наблюдения хорошо согласуются с нашими данными относительно терморегуляторного разобщения в скелетных мышцах, описанными в предыдущем разделе, и фактом активации на холоду несопряженного дыхания в митохондриях печени. Об этом эффекте пойдет речь ниже.

5.4.2.3. Печень

Митохондрии печени отличаются от митохондрий «быстрых» скелетных мышц и бурого жира, в частности, тем, что в их внешней мембране имеется очень активный путь свободного окисления:

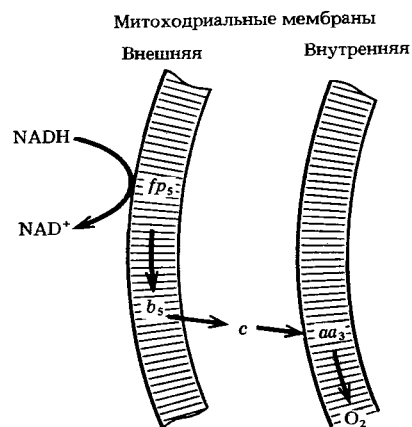


Рис. 97. Путь окисления внешнего NADH печеночными митохондриями крысы, подвергнутой воздействию холода

Объяснения в тексте

что митохондрии не способны окислять внешний NADH со сколько-нибудь заметной скоростью.

Ситуация меняется, если животное перед опытом на митохондриях было подвергнуто воздействию холода. Как показали в нашей лаборатории Е. Н. Мохова и сотр. [64, 1066], 15-минутное выдерживание на холоде крыс, предварительно подвергнутых серии холодовых стрессов, приводит к освобождению в межмембранное пространство части фонда цитохрома c , сорбированного на внешней поверхности внутренней мембраны печеночных митохондрий. Этот эффект сопровождается активацией внешнего пути окисления NADH. Для его реализации, как и для других терморегуляторных изменений в печени, необходимы тиреоидные гормоны [149, 622] (рис. 97).

Внешний путь окисления NADH не чувствителен к ротенону и амиталу, ингибиторам NADH— CoQ -редуктазы. С. П. Маслову и И. Н. Ивашкиной [88] удалось показать снижение чувствительности к амиталу дыхания животного *in vivo*. Инъекции амитала слабее тормозили газообмен мышей, предварительно адаптированных к холоду. Это наблюдение свидетельствует о том, что амитал-устойчивое дыхание вносит заметный вклад в дыхание животного в условиях повышенной теплоотдачи. Помимо печени, здесь могли бы участвовать и почки, митохондрии которых также содержат цитохром b_5 , хотя соотношение $b_5:aa_3$ в этой ткани втрое ниже, чем в печени [125]. В скелетных мышцах цитохрома b_5 нет совсем. Тем не менее внешний NADH окисляется с измеримой скоростью, если добавить в инкубационную среду цитохром c [2]. Остается

NADH — цитохром b_5 . Процесс катализируется флавиновой NADH-цитохром b_5 -редуктазой (другое название флавопротеин-5, или fp_5).

Этот путь был открыт Ленинджером в 1951 г. [920]. В течение длительного времени он оставался загадкой митохондриологии, так как, несмотря на высокую скорость переноса электронов от NADH к цитохрому b_5 , дальнейшая судьба восстановительных эквивалентов оставалась неясной. В использованных условиях опыта восстановленный цитохром b_5 переносил электроны на добавленный цитохром c , но не на эндогенный цитохром c митохондрий. В результате считалось,

открытым вопрос о том, какое отношение имеет последняя система к терморегуляторной продукции тепла.

Другая проблема, ожидающая своего решения, — это механизм восстановления того NADH, который окисляется внешним путем. Субстратами, расщепление которых может привести к восстановлению цитоплазматического NAD⁺, могут быть: 1) глюкоза и гликоген, дающие NADH в реакции гликолитической оксидоредукции; 2) глицерин, освобождающийся при гидролизе триглицеридов и окисляющийся глицериндегидрогеназой с последующим подключением к цепи реакций гликолиза; 3) некоторые аминокислоты и их метаболиты, расщепляющиеся с участием NAD-связанных дегидрогеназ в цитозоле, и т. д. Кроме того, фонд внутримитохондриальных восстановительных эквивалентов может быть, в принципе, использован для восстановления NAD⁺ в цитозоле, если соотношение $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ вне митохондрии оказывается ниже, чем внутри, и если $\Delta\mu\text{H}$ низка. В таких условиях возможно обращение малат-глутамат-аспартатного челночного механизма, обычно используемого для окисления цитоплазматического NADH митохондриальным NAD⁺.

Итак, митохондрии мышц, бурого жира и печени принимают участие в терморегуляторной продукции тепла тремя различными способами. В мышцах и буром жире протонный потенциал, образуемый дыхательными $\Delta\mu\text{H}$ -генераторами, рассеивается в виде тепла посредством жирных кислот, которые в первом случае взаимодействуют с АТФ/АДФ-антипортером, а во втором — с термогенином. В печени $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы начального и среднего участков дыхательной цепи шунтируются несопряженной NADH-цитохром c -редуктазой, локализованной во внешней митохондриальной мембране и образующей тепло, минуя стадии генерации и рассеяния $\Delta\mu\text{H}$.

5.4.3. Терморегуляторная активация свободного окисления у растений

Согласно широко распространенной догме, терморегуляция представляет собой функцию, присущую только высшим животным. Однако природа, не столь догматичная, как ее исследователи, иногда преподносит им свои сюрпризы. Проблема лишь в том, что мы зачастую склонны игнорировать эти ее подарки.

В 1778 г. Ламарк обратил внимание на то, что температура в основании распустившегося цветка лилии рода *Agilum* заметно выше, чем в других частях того же растения. В 1851 г. Гарэ, работая с тем же объектом, показал хорошее соответствие между потреблением кислорода и продукцией тепла в цветах. Биохимические исследования начались в 1932 г., когда Окунуки описал цианид- и CO -устойчивое дыхание в пыльце *Lilium auratum*. Систематическое изучение биоэнергетических аспектов этого феномена

было предпринято только в 1970-е годы нашего столетия (см. обзор: [1016]).

Выяснилось, что термогенез выражен особенно явно в цветках таких видов ароидных лилий, как *Arum italicum* и *A. maculatum*, а также водяной лилии *Victoria*, *Symplocarpus foetidus*, *Schizocasia porteii*, *Philodendron selloum*, *Sauromatum guttatum* и некоторых других цветковых растений. Сердцевидная часть соцветия *Symplocarpus* полностью покрыта мелкими цветами, которые разогреваются в момент цветения. У *Arum* и *Sauromatum* теплопродукция локализована в специализированных на этой функции отростках, имеющих вид пальцев или булавы. Органами теплопродукции *Philodendron selloum* служат рудиментарные тычиночные цветки.

Гиперпродукция тепла и вспышка дыхательной активности длятся в течение примерно 12 ч, что необходимо для испарения пахучих веществ, обычно аминов или индолов, привлекающих насекомых-опылителей. Терморегуляторный механизм, основывающийся на дыхании, делает процесс испарения не зависимым от температуры окружающей среды.

Разница температур между цветком восточной капусты и воздухом достигает 35° ($+20^{\circ}$ в цветке при -15° в воздухе) [862]. У *Philodendron selloum*, *Symplocarpus foetidus*, *Colocasia odora* и *Schizocasia porteii* эта разница может превышать 20° [1016].

Снижение окружающей температуры приводит к сильной активации дыхания (традиционно считалось, что такой эффект есть прерогатива теплокровных животных). Например, снижение температуры среды с $+15^{\circ}$ до $+5^{\circ}$ вызывает ускорение в 3,5 раза дыхания цветков восточной капусты [862]. Максимальная скорость поглощения кислорода достигает $25-40 \text{ мл} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ [862, 904, 1088], что служит исключением в мире растений и близко к наивысшим скоростям дыхания животных тканей.

Митохондрии термогенных отростков *Sauromatum* перед цветением имеют обычное дыхание, чувствительное к цианиду и сопряженное с фосфорилированием (коэффициент P/O для окисления малата порядка 2,7). В день цветения дыхание разобщается и утрачивает чувствительность к цианиду и антимицину [1603].

Описаны случаи, когда термогенез обусловлен исключительно активацией шунтов свободного окисления. При этом один из $\Delta\bar{P}H$ -генераторов может сохраняться. Скорость дыхания возрастает столь значительно, что уровень АТФ растет, несмотря на снижение величины P/O. Концентрация АТФ падает в тех случаях, когда наряду с включением шунтов свободного окисления в клетках накапливаются разобщители [1016]. Как и у животных, роль разобщителей, по-видимому, играют жирные кислоты [1603]. Измерение газообмена цветков *Philodendron selloum* показало, что в условиях вспышки дыхания основными субстратами становятся жиры [1361].

Гиперпродукция тепла сопровождается увеличением числа митохондрий (вероятно, за счет их деления и роста). Вновь образующиеся митохондриальные мембраны содержат больше NADH-дегидрогеназы и негемового железопротейда, действующего в качестве цианидустойчивой оксидазы, чувствительной к комплексонам на железо (гидроксамату, α , α' -дипиридину, тиоцианату и γ -оксихинолину) (см. обзор: [1016]).

Таким образом, растения используют в принципе те же механизмы срочной теплопродукции, что и животные, а именно разобщение и включение шунтов несопряженного окисления в дыхательной цепи.

Терморегуляторная активация свободного дыхания контролируется первично световым режимом и вторично особыми низкомолекулярными гормонами — калоригенами I и II [371].

В настоящее время вырисовывается следующая цепь явлений, приводящая в конечном итоге к термогенезу в цветках некоторых растений: 1) перед цветением свет вызывает образование некоторых гормонов, контролирующих биогенез, структуру и функции митохондрий; 2) гормоны стимулируют, во-первых, деление крупных митохондрий на более мелкие, во-вторых, повышение количества NADH-дегидрогеназы и самоокисляющегося негемового железопротейда, которые формируют цепь, устойчивую к антимицину и цианиду, и, в-третьих, липолиз триглицеридов; 3) активация свободного окисления, шунтирующего $\Delta\bar{P}H$ -генераторы среднего и конечного сегментов дыхательной цепи, и возрастание концентрации жирных кислот, сбрасывающих $\Delta\bar{P}H$, образуемую в начальном сегменте цепи, приводит к резкому ускорению дыхания и образования тепла (см. обзоры: [1016, 1070]).

Очевидно, что весь этот каскад должен как-то контролироваться температурой среды. Механизм такого контроля представляет интересной проблемой для будущих исследований.

Другой вопрос состоит в том, используют ли растения терморегуляторную активацию свободного окисления для целей, иных, чем испарение аттрактантов. В данной связи следует отметить результаты работ В. К. Войникова и соавт., показавших снижение протонного контроля и усиление антимицин- и цианидустойчивого дыхания митохондрий, выделенных из проростков озимых хлебных злаков, охлаждавшихся в течение 1 ч при температуре воздуха -4° [35—37]. При этом содержание свободных жирных кислот в митохондриях возрастало в 2—3 раза [36]. Интересно, что проростки удерживали свою температуру в течение получаса на $7-10^{\circ}$ выше, чем температура воздуха [37]. У яровых злаков все эти эффекты не наблюдались [35].

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы исключить возможность того, что снижение дыхательного контроля обусловлено не действием жирных кислот *in vivo*, а их реабсорбцией митохондриями при разрушении клетки. С этой целью желательны

измерения *in vivo* уровня высокоэнергетических фосфатов, чувствительности дыхания проростков к ингибиторам и т. д.

Из почек платана получен флавоон, названный платанетином, который оказался наиболее сильным природным разобщителем (полное разобщение наступает при концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М). Платанетин в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М индуцирует самоокисление NADH-дегидрогеназы кислородом [1242]. Остается выяснить, имеет ли это вещество отношение к регуляторной продукции тепла.

Глава 6

Регуляция, транспорт и стабилизация протонного потенциала

6.1. Регуляция $\Delta\bar{p}H$

Ферменты, образующие и потребляющие $\Delta\bar{p}H$, могут контролироваться, подобно другим энзиматическим системам, всем набором регулирующих воздействий, которым располагают клетка и организм. Ряд примеров такого рода регуляции был описан в предыдущих разделах этой книги. В данной главе мы обсудим особые механизмы, специально изобретенные живой природой, чтобы регулировать $\Delta\bar{p}H$.

Некоторые из них мы уже рассмотрели в предшествующей главе применительно к функции свободного окисления в терморегуляции. В следующем разделе будет показано, что процессы свободного окисления, часто в комбинации с окислением сопряженным, имеют гораздо более широкое значение, чем образование тепла.

6.1.1. Альтернативные функции дыхания

Когда в 1932 г. Окунуки описал цианид- и СО-устойчивое дыхание пыльцы одного из линейных, это произошло почти одновременно с открытием В. А. Энгельгардтом фосфорилирующего дыхания в эритроцитах птиц. Поэтому неудивительно, что Окунуки не уточнил, сопряжено ли с фосфорилированием открытый им новый путь окисления.

Огромный успех направления исследований, начало которым положил В. А. Энгельгардт, привело, как это часто бывает, к появлению догмы, переоценивавшей роль фосфорилирующего окисления. Стало принято считать биологически полезным только то дыхание, которое сопряжено с образованием АТФ. Если кто-либо обнаруживал дыхание, не связанное с фосфорилированием, то это наблюдение описывали на счет артефакта *in vitro* или патологии *in vivo*.

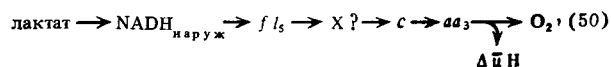
В 1958 г. мы противопоставили этой догме противоположную точку зрения, постулировав, что клеточное дыхание *in vivo* в норме происходит не только сопряженно с запасанием энергии, но и без такого сопряжения (этот второй тип дыхания был назван свободным). Было высказано предположение, что свободное дыхание участвует в терморегуляторном образовании тепла, в образовании или разрушении метаболитов, детоксикации ксенобиотиков и даже (косвенно) в запасании энергии [121, 123, 135].

Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы исследовали образование тепла в организме теплокровных, подвергнутых воздействию

холода. Как уже отмечалось выше, свободное окисление действительно активируется в мышцах и печени. Впоследствии подобный эффект был описан другими исследователями в буром жире и в цветах некоторых растений.

Что касается неэнергетических функций свободного окисления, то их наиболее наглядным примером могут служить системы, обеспечивающие разрушение конечных продуктов метаболизма и токсичных веществ-ксенобиотиков.

В 1962 г. мы обнаружили, что коэффициент Р/О при окислении лактата кислородом в мышцах оказывается значительно ниже, чем при использовании других субстратов дыхания, окисляющихся через NAD^+ [123]. Этот факт был расценен как указание на роль свободного окисления в ликвидации избытка лактата, накапливающегося при тяжелой физической работе. Как показали последующие опыты, проведенные в нашей группе [2], в мышечных митохондриях существует ротенон- и антимицинустойчивый путь окисления немитохондриального NADH . Подобно аналогичной системе в печени, этот путь требует присутствия цитохрома c в межмембранном пространстве митохондрии, он тормозится цианидом и низкими концентрациями мерсалила [2, 1478]. Главное отличие от печени состоит в том, что в мышечных митохондриях не удается обнаружить цитохром b_5 . Поскольку в цитозоле есть активная лактатдегидрогеназа [142], был постулирован следующий механизм, представляющий, по сути дела, комбинацию свободного и сопряженного окисления в дыхательной цепи:



где X — неизвестный переносчик, по-видимому, заменяющий в мышцах цитохром b_5 .

Активация этого пути при тяжелой физической работе может быть обусловлена развивающимся в этих условиях набуханием мышечных митохондрий [626]. Как было отмечено А. А. Ясайтисом [773], набухание печеночных митохондрий благоприятно для включения внешнего пути окисления, по-видимому, из-за уменьшения объема межмембранного пространства, приводящего к увеличению концентрации свободного цитохрома c на единицу объема заключенной в этом пространстве жидкости.

В этой связи уместно отметить, что окисление лактата в митохондриях дрожжей идет в обход начальных и средних участков фосфорилирующей дыхательной цепи. В обходном пути свободного окисления участвует цитохром b_2 , заключенный в межмембранном пространстве, а также цитохромоксидаза. NAD не нужен для окисления лактата дрожжевыми митохондриями [75, 170, 995]. По данным Броди и соавт. [307], клетки *Mycobacterium*

phlei окисляют лактат быстрее, чем другие субстраты, но без фосфорилирования.

Впечатляющий прогресс был достигнут при изучении систем свободного окисления, ответственных за детоксикацию ксенобиотиков. В мембране эндоплазматического ретикулума клеток печени были обнаружены особые дыхательные цепи, включающие: 1) цитохром P-450 в качестве конечной оксидазы и 2) NADPH -цитохром P-450-редуктазу или NADH -цитохром b_5 -редуктазу и цитохром b_5 [545, 755]. Эти цепи участвуют в окислении множества ксенобиотиков. Образующие их ферменты находятся в клетке в большом количестве. Например, концентрация цитохрома P-450 в определенных условиях может превышать концентрацию любого другого цитохрома в печени [7].

Свободное дыхание, катализируемое цитохромом P-450, участвует не только в деструктивных, но также и в некоторых конструктивных процессах, которые обычно локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. Однако, пожалуй, наиболее наглядный пример — это митохондрии коры надпочечника. Показано, что начальный и конечный этапы образования стероидных гормонов (кортизона и альдостерона) осуществляются двумя видами цитохрома P-450, находящимися во внутренней мембране этих митохондрий. Там же имеется особая редокс-цепь, восстанавливающая цитохром P-450. Она окисляет внутримитохондриальный NADPH посредством NADPH -адренородоксинредуктазы — флавопротеида, содержащего FAD . Последний восстанавливает адренородоксин — негемовый железопротеид, служащий донором электронов для цитохрома P-450. Все эти окислительные реакции не сопряжены с генерацией $\Delta \bar{\mu} \text{H}$, которая образуется обычной фосфорилирующей дыхательной цепью, локализованной в той же самой мембране (см. обзор: [1486]).

Интересный пример мощной активации свободного дыхания описан в лейкоцитах, атакующих бактериальную клетку. В этом случае особые внутриклеточные пузырьки сливаются с внешней клеточной мембраной лейкоцита. Такой эффект имеет следствием вспышку свободного дыхания, в котором участвует цепь окисления NADH и NADPH , включающая флавопротеиды и самоокисляющийся цитохром типа b . Цитохром b катализирует одноэлектронное восстановление O_2 до супероксидного радикала, который реагирует с Cl^- под действием миелопероксидазы с образованием радикальной формы хлора. Последняя, будучи чрезвычайно токсичной, убивает бактерии. Описанная цепь реакций прерывается аскорбатом, восстанавливающим супероксидный радикал [591, 1074, 1270].

Нетрудно объяснить, почему перечисленные выше процессы поглощения кислорода не сопряжены с генерацией $\Delta \bar{\mu} \text{H}$. Энергетическое сопряжение неизбежно усложнило бы выполнение деструктивных или конструктивных функций всеми этими фермент-

ными системами, которые имеют жизненно важное значение для организма.

Итак, мы рассмотрели четыре главные функции окислительных процессов: 1) запасание энергии, утилизируемой в форме $\Delta\bar{p}H$, 2) рассеяние энергии в виде тепла, 3) образование полезных соединений и 4) расщепление вредных веществ. Можно было бы думать, что первая из перечисленных функций непосредственно обеспечивается сопряженным, а три другие — свободным дыханием. Однако такой взгляд слишком упрощает реальную ситуацию.

Сопряженное дыхание участвует в некоторых случаях в осуществлении функций 2—4. Так, мышечная дрожь при первом охлаждении животного в качестве механизма срочной теплопродукции требует образования $\Delta\bar{p}H$, а затем и АТР, используемого актомиозином в качестве субстрата.

Ясно также, что большинство конструктивных процессов нуждается в энергии АТР, образуемого сопряженным дыханием. Что касается деструктивных реакций, то они, как правило, обходятся без АТР, хотя и здесь есть ряд важных исключений. Достаточно вспомнить цикл синтеза мочевины из аммиака, использующий энергию АТР.

На первый взгляд, свободное дыхание, по определению, не может участвовать в запасании энергии. Парадоксально, что есть случаи, когда это не так. Например, свободное окисление $NADH$ цитозоля митохондриальным CoQ посредством α -глицерофосфатного «челнока» питает восстановительными эквивалентами дыхательную цепь на уровне комплекса b_c . В результате первый генератор не участвует в запасании энергии. Однако часть энергии $NADH$ удается превратить в $\Delta\bar{p}H$ за счет работы двух других $\Delta\bar{p}H$ -генераторов.

Альтернативная возможность состоит в том, что цитозольный $NADH$ без всякого запасания энергии окислится, например, в эндоплазматическом ретикулуме посредством $NADH$ -цитохром b_5 -редуктазы, цитохрома b_5 и цитохрома P-450 (подробнее см. следующий раздел).

Надо помнить, что $NADH$ — CoQ -редуктазный этап — обычно самый медленный во всей дыхательной цепи. В определенных условиях оказывается выгодным обойти этот сегмент, шунтировав его свободным переносом электронов, чтобы резко ускорить дыхание и получить выигрыш в скорости синтеза АТР, несмотря на снижение термодинамического КПД. Примечательно, что митохондрии летательной мышцы мухи, которая относится к самым быстрым сократительным элементам живой природы, содержат чрезвычайно активную α -глицерофосфатдегидрогеназу. Эта система позволяет достичь максимальной скорости дыхательного синтеза АТР и окислить цитозольный $NADH$, образуемый при гликолизе. Наряду с этим летательные мышцы насекомых имеют еще ряд особенностей, позволяющих им поддерживать очень

высокую сократительную активность. Так, они содержат трахеолы, проникающие в тельце митохондрии, чтобы поставлять газообразный кислород прямо к месту его потребления.

В 1962 г. нами было высказано предположение о том, что максимальная скорость синтеза АТР и предельная эффективность этого процесса не могут достигаться одновременно одной и той же системой и что наивысший темп образования АТР должен поддерживаться комбинацией сопряженного и свободного окисления [123]. В 1980 г. Стуки [1466, 1467] представил расчеты, основанные на принципах термодинамической оптимизации, согласующиеся с нашей концепцией. Есть данные, что митохондрии, выделенные из мышц и печени после мышечной работы большой интенсивности, оказываются в частично разобщенном состоянии [435, 859]. В печени было найдено, что разобщение опосредовано жирными кислотами [859].

Еще один биоэнергетически благоприятный эффект при комбинации сопряженного и свободного окисления может состоять в следующем. Равновесное соотношение $[ATP]/[ADP] \cdot [P_i]$ будет тем выше, чем больше энергии выделяется при той окислительной реакции, с которой сопряжен синтез АТР. Это значит, что, шунтировав свободным окислением один или два $\Delta\bar{p}H$ -генератора дыхательной цепи, мы в принципе можем сдвинуть указанное равновесие в сторону синтеза АТР, который образуется за счет протонного потенциала, поддерживаемого оставшимся $\Delta\bar{p}H$ -генератором.

Известно, что начальный участок сопряженной дыхательной цепи — не только самый медленный, но и наиболее уязвимый. Как уже отмечалось, широкий круг гидрофобных ксенобиотиков блокирует дыхание именно в этом пункте цепи [231, 1635]. Шунтировав заторможенное место цепи свободным окислением, мы можем вновь активировать дыхательный синтез АТР, хотя, конечно, и со сниженным КПД. Такой эффект должен быть особенно актуален для митохондрий в печени — органе, специализированном на аккумуляции гидрофобных ксенобиотиков с целью их последующего разрушения при помощи цитохрома P-450.

Существенно, что торможение дыхательной цепи на уровне $NADH$ — CoQ -редуктазы вызывает помимо ухудшения энергоснабжения еще какой-то неспецифический повреждающий эффект в митохондриальной мембране. Как было показано в нашей группе Л. С. Ягужинским и сотр. [1635], для повреждения требуются аэробные условия и высокое отношение $NADH/NAD^+$ (см. также [1487]).

Шунтирование заторможенной $NADH$ — CoQ -редуктазы может достигаться десорбцией цитохрома с в межмембранное пространство или добавлением витамина K_3 (менадиона) либо викасола, которые активируют дикумарол-чувствительную ДТ-диафорузу. Неясно, однако, стимулируется ли эта система, показанная

Таблица 16. Функции свободного и сопряженного дыхания

Функция	Тип дыхания	Механизм	Пример
Запасание энергии	Сопряженное	Генерация $\Delta\bar{p}H$	Митохондриальная дыхательная цепь, окисляющая NADH
То же	Свободное	Перенос электронов в обход некоторых сегментов сопряженной цепи, что повышает скорость генерации $\Delta\bar{p}H$ в остальных сегментах	Активация фосфорилирующего дыхания, заторможенного на этапах до цитохромоксидазы, путем включения шунтов через менадион или систему $fp_5 - b_5$
Рассеяние энергии	Сопряженное	Генерация $\Delta\bar{p}H$, используемой для синтеза АТР, гидролизуемого актомиозином	Мышечная дрожь при первом охлаждении теплокровного животного
То же	Свободное	Рассеяние образованной дыханием $\Delta\bar{p}H$ благодаря разобщающему действию жирных кислот	Несократительный термogenesis в скелетных мышцах и буром жире животных при повторных охлаждениях
»	»	Перенос электронов в обход $\Delta\bar{p}H$ -генераторов сопряженной цепи	Термогенез в печени животных (при повторных охлаждениях) и в цветках некоторых растений
Образование полезных веществ	Сопряженное	Генерация $\Delta\bar{p}H$ и образование АТР для биосинтезов	Большинство биосинтезов
То же	Свободное	Специализированные дыхательные цепи	Этапы биосинтеза стероидных гормонов в митохондриях надпочечника при участии дыхательной цепи: $XADPH \rightarrow fp \rightarrow$ адрендоксин $\rightarrow P-450$
Удаление вредных веществ	Сопряженное	Генерация $\Delta\bar{p}H$ и образование АТР для процессов детоксикации	Включение аммиака в цикл синтеза мочевины
То же	Свободное	Специализированные дыхательные цепи	Дыхательная цепь эндоплазматического ретикула, окисляющая ксенобиотики

in vitro, в организме при интоксикации гидрофобными ксенобиотиками. В то же время установлено, что искусственное введение менадиона оказывает выраженный благоприятный терапевтический эффект при наследственном нарушении среднего участка дыхательной цепи (подробнее см. ниже раздел 8.2.1).

Бактериальные дыхательные цепи зачастую содержат неполный набор $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, представляя собой комбинацию свободного и сопряженного окисления (раздел 3.4.7). Более высокая устойчивость таких цепей к неблагоприятным внешним условиям может служить ключом к объяснению парадоксального факта, что термодинамически менее эффективные системы не были выбракованы отбором и сохранились до наших дней.

Говоря в более общей форме, мы можем заключить, что наличие редокс-цепей свободного окисления сообщает метаболизму как бы дополнительную степень свободы. Это может оказаться особенно важным в критических ситуациях. В рамках такой концепции нетрудно, например, понять, почему у многих растений, грибов и бактерий цианрезистентное свободное дыхание сосуществует с сопряженной дыхательной цепью, активируясь на определенных стадиях клеточного цикла [1116].

Соотношение альтернативных функций клеточного дыхания суммировано в табл. 16.

6.1.2. Регуляция потоков восстановительных эквивалентов между цитозолем и митохондриями

Если два пути окисления — свободный и энергетически сопряженный — сосуществуют в одной и той же клетке, возникает проблема, как предотвратить утилизацию всех восстановительных эквивалентов по тому из них, который термодинамически более выгоден. Без сомнения пространственное разграничение (компарментализация) метаболических процессов играет ведущую роль в решении этой проблемы. Так, например, дегидрогеназы основных субстратов локализованы в матриксе, так что восстановительные эквиваленты, питающие дыхательную цепь, образуются непосредственно внутри митохондрий и потому сами по себе недоступны для внешних систем свободного окисления. Кроме того, во внутренней митохондриальной мембране имеется несколько $\Delta\bar{p}H$ -зависимых переносчиков, ответственных за аккумуляцию в матриксе тех субстратов, чьи дегидрогеназы имеются не только в митохондриях, но и в цитозоле. Если же дегидрогеназа данного субстрата локализована исключительно в цитозоле, то используются особые челночные механизмы, переносящие восстановительные эквиваленты из цитозоля в матрикс.

На рис. 98, а показан малат-аспартат-глутаматный челнок. Действие этой системы приводит к окислению внемитохондриального NADH посредством NAD^+ матрикса. В процессе участвуют

два фермента, локализованные по обе стороны внутренней мембраны митохондрий, — малатдегидрогеназа и аспартат:глутамат-аминотрансфераза. Кроме того, необходимы два переносчика: антипортер дикарбоновых кислот и глутамат/аспартат-антипортер. Последний использует энергию $\Delta\bar{\mu}H$, поскольку он катализирует обмен аспартат²⁻/(глутамат²⁻ + H⁺). В результате перенос гидрид-иона от NADH⁺_{наруж} к NAD⁺_{внутр} оказывается сопряженным с перемещением одного иона H⁺ из цитозоля в матрикс под действием $\Delta\bar{\mu}H$ [1106]. Напомним, что окисление одного NADH_{внутр} кислородом посредством сопряженной дыхательной цепи приводит к переносу 10 ионов H⁺ против $\Delta\bar{\mu}H$ (см. разд. 3.4.8).

Другой челночный механизм (рис. 98, б) использует две глицерофосфатдегидрогеназы: цитозольную, зависящую от NAD, и митохондриальную, восстанавливающую CoQ без участия NAD [1106]. По сути дела, эта система представляет собой еще один случай свободного окисления на начальном этапе дыхательной цепи. Рассеяние энергии, по-видимому, необходимо, чтобы сделать термодинамически более выгодным окисление NADH_{наруж} митохондриальной дыхательной цепью. Итак, оба шунта включают экзергонические стадии, но способы выделения энергии различны: движение H⁺ по $\Delta\bar{\mu}H$ в первом случае и свободное окисление во втором.

Неудивительно, что вышеупомянутые челночные системы жестко контролируются регуляторными системами. Они тканеспецифичны. Например, малатный челнок очень активен в печени, но отсутствует в сердце, где митохондрии лишены дикарбоксилатного антипортера [1106]. Глицерофосфатный челнок резко активируется тиреоидными гормонами [337]. Как уже отмечалось, терморегуляторная активация окисления внешнего NADH митохондриями печени также находится под тиреоидным контролем [64].

Другим примером пространственного разделения окислительного обмена могут быть пероксисомы. Эти органеллы окружены мембраной, напоминающей по проницаемости внешнюю митохондриальную. Она непроницаема для белков, но легко пропускает низкомолекулярные вещества. Поглощение кислорода пероксисомами обусловлено действием уратоксидазы, оксидазы D-аминокислот и оксидазы α -оксикислот. Пероксисомы не конкурируют с сопряженным дыханием митохондрий, поскольку субстраты этих оксидаз окисляются без участия NAD(P) и дыхательной цепи. Токсический продукт реакции — перекись водорода — немедленно разлагается внутри пероксисом каталазой, самым массовым белком этих органелл.

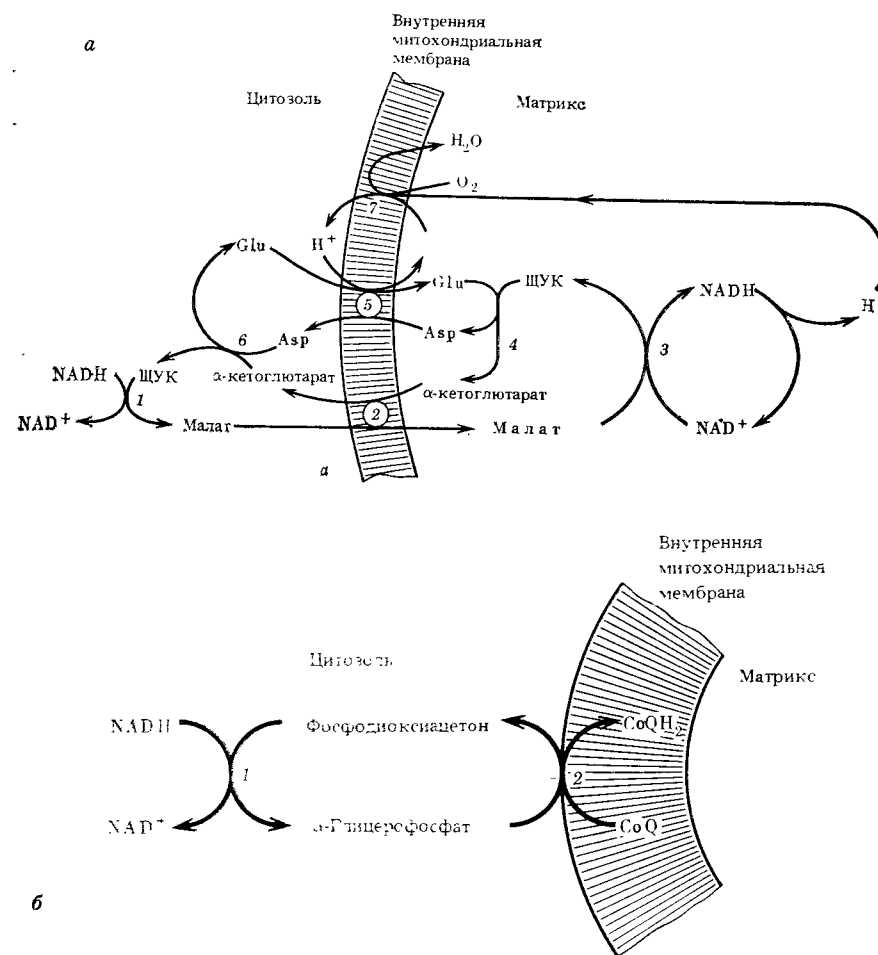


Рис. 98. Два челночные системы для окисления цитозольного NADH митохондриальной дыхательной цепью

а — NADH_{наруж} восстанавливает шавелевоуксусную кислоту (ШУК) посредством обращения реакции, катализируемой цитозольной малатдегидрогеназой (1). Образованный таким путем малат переносится в матрикс в обмен на α -кетоглутарат при участии антипортера дикарбоксилатов (2). В матриксе малат восстанавливает NAD⁺ митохондриальной малатдегидрогеназой (3). Полученная ШУК переаминируется с глутаматом, давая аспартат и α -кетоглутарат (4). Внутренний аспартат обменивается на внешний глутамат и H⁺ при помощи аспартат²⁻/(глутамат²⁻ + H⁺)-антипортера с использованием энергии $\Delta\bar{\mu}H$ (5). Внешний аспартат переаминируется с внешним α -кетоглутаратом, регенерируя внешнюю ШУК (6). $\Delta\bar{\mu}H$, потребляемая в реакции (5), возобновляется дыхательной цепью (7); б — внешний NADH восстанавливает фосфодигидроксиацетон до глицерофосфата при помощи цитозольной NAD⁺-зависимой глицерофосфатдегидрогеназы (1). Глицерофосфат диффундирует к внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий, где окисляется в фосфодигидроксиацетон митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназой — флавопротеином, переносящим электроны с глицерофосфата на CoQ без участия NAD (2) (по: Никольс [1106]).

6.1.3. Взаимопревращение $\Delta\psi$ и ΔpH

Без сомнения, взаимопревращения $\Delta\psi$ и ΔpH могут иметь регуляторное значение. Такого типа эффект должен влиять, во-первых, на соотношение $\Delta\psi$ - и ΔpH -зависимых транспортных систем, во-вторых, на количество энергии, запасенной мембраной (см. ниже раздел 6.3.1), и, в-третьих, на значение pH по крайней мере с одной стороны мембраны.

Чтобы превратить $\Delta\psi$ в ΔpH , достаточно электрофоретически перенести через мембрану любой ион кроме H^+ . В митохондриях есть только один крупномасштабный процесс такого рода, а именно $ATP_{\text{внутри}}^{4-}/ADP_{\text{наруж}}^{3-}$ -антипорт, питающий H^+ —АТР-синтазу одним из ее субстратов. Однако в условиях, когда митохондрии синтезируют АТР, этот антипорт всегда сопровождается ΔpH -зависимым стехиометрическим симпортом $H_2PO_4^-$ и H^+ , который поставляет в митохондрию фосфат — второй субстрат реакции образования АТР. В результате, как правило, митохондрия поддерживает ΔpH в основном в форме $\Delta\psi$. Тем не менее иногда $\Delta\psi$ снижается, а ΔpH возрастает. Такой эффект наблюдал, в частности, Кауппинен [823], измерявший $\Delta\psi$ и ΔpH в митохондриях перфузированного сердца *in situ*. Переход $\Delta\psi \rightarrow \Delta pH$ наблюдался при увеличении частоты сокращений от 1,5 до 5 Гц.

Чен и соавт. [780] прокрасили метилродамином митохондрии клеток в культуре ткани. Как отмечалось в разделе 2.1.3.4, катион метилродамина электрофоретически накапливается в митохондриях и потому красит только те из них, которые имеют $\Delta\psi$, но не ΔpH . На одной из фотографий можно было видеть две соседние клетки, не отличающиеся по морфологии. Однако только в одной из них митохондрии накапливали метилродамин. Добавление нигерицина, превращающего ΔpH в $\Delta\psi$ путем обмена H^+ на K^+ , вызывало окрашивание митохондрий также и во второй клетке.

Существует ряд указаний [594, 993, 1117], что митохондрии располагают своим собственным K^+, H^+ -антипортером, который обычно находится в латентной форме. Одно из условий для его активации — снижение концентрации Mg^{2+} в матриксе [594, 993]. Согласно Мартину и соавт. [993], K^+/H^+ -антипортер представляет собой белок массой 82 кДа, активность которого тормозится ДЦКД и хинином.

Эффект ионов магния мог бы иметь биологическое значение в смысле страховки митохондрий от чрезмерного защелачивания матрикса. При повышении ΔpH должна снижаться $\Delta\psi$, удерживающая Mg^{2+} в матриксе. Снижение $[Mg]_{\text{внутри}}^{2+}$ оказывается сигналом для включения K^+/H^+ -антипортера, действие которого приводит к превращению ΔpH обратно в $\Delta\psi$.

Одним из факторов, вызывающих переход $\Delta\psi$ в ΔpH , может быть унипорт Ca^{2+} в митохондрии. Однако этот процесс, как

правило, имеет ограниченное значение из-за очень низкого (10^{-7} М — 10^{-6} М) уровня Ca^{2+} в цитозоле. Что касается K^+ , концентрация которого в цитозоле около 0,1 М, его массовый унипорт в митохондрии должен быть запрещен, так как распределение K^+ по $\Delta\psi$ привело бы к аккумуляции очень высокой концентрации КОН в матриксе. Несмотря на это очевидное обстоятельство, в митохондриальной мембране может появляться K^+ -проводимость, по крайней мере *in vitro*. Тогда ΔpH образуется в результате входа K^+ . Как правило, эта ΔpH нестабильна из-за активации упомянутого выше K^+/H^+ -антипортера. Одновременное действие K^+ -унипортера и K^+, H^+ -антипортера вызывает разобщение.

Как было показано А. В. Пановым [110, 1165], связывание ацил-СоА с АТР/АДР-антипортером тормозит перенос нуклеотидов и повышает проницаемость мембраны для H^+ и K^+ . Этот эффект конкурентен к АДР и АТР. Он вызывается физиологическими концентрациями ацил-СоА ($K_i = 5 \cdot 10^{-7}$ М). Повышение K^+ -проводимости через АТР/АДР-антипортер может, в принципе, повлечь за собой переход $\Delta\psi$ в ΔpH .

В рамках схемы, приведенной выше на рис. 94 (раздел 5.4.2.1), повышение H^+ -проводимости могло бы быть обусловлено эндогенными жирными кислотами. Что касается транспорта K^+ , то он также мог быть связан с действием жирных кислот, если они переносят K^+ в форме $R-COOK$.

Импорт K^+ служит, по-видимому, главным механизмом превращения $\Delta\psi$ в ΔpH у бактерий, существующих при гораздо более низкой концентрации K^+ снаружи, чем митохондрии. Этот процесс мы рассмотрим ниже в связи с проблемой ΔpH -буферов (раздел 6.3.1).

В хлоропластах ΔpH находится в основном в форме ΔpH из-за высокой проницаемости мембраны тилакоидов для Cl^- , K^+ и Mg^{2+} .

6.1.4. Отношение системы контроля ΔpH к основным регуляторным механизмам эукариот

В организмах эукариот надклеточные регуляторы, такие, как гормоны, передают свои команды при помощи внутриклеточных медиаторов, называемых вторичными посредниками. Среди них наиболее часто используется Ca^{2+} , циклические нуклеотиды и продукты расщепления фосфатидилинозитдифосфата — трифосфоинозит и диацилглицерид. В последнее время все большее внимание уделяется такому регулятору с множественным действием, как ион H^+ (см. ниже раздел 7.5).

Иногда в качестве вторичных посредников используются метаболиты, регулирующие пути своего собственного превращения в клетке. В разделах 5.4.2.2 и 5.4.2.3 мы уже столкнулись с по-

добной ситуацией, когда рассматривали терморегуляторное разобщение. Жирные кислоты выступают не только как субстраты окисления, но и как разобщители этого окисления и ингибиторы АТФ/АДР-антипортера. Недавно был описан еще один регуляторный эффект жирных кислот. Оказалось, что они вызывают десорбцию гексокиназы, связанной с внешней мембраной митохондрий [859]. Это может облегчить жирным кислотам конкуренцию за АТФ с глюкозой в реакциях образования соответственно ацил-СоА и глюкозо-6-фосфата. Оба эти процесса могут происходить на поверхности внешней митохондриальной мембраны. Жирные кислоты, сорбируясь на мембране, повышают отрицательный заряд, что приводит к разрушению комплекса гексокиназы с ее рецептором. Роль последнего выполняет порин.

Что касается «классических» вторичных посредников, то применительно к митохондриям особенно тщательно изучены ионы Ca^{2+} . Накапливаясь в митохондриях, они превращают $\Delta\psi$ в ΔpH . Кроме того, они активируют фосфолипазу A_2 . Последняя образует жирные кислоты, вызывающие все те эффекты, о которых шла речь выше. Другой продукт действия фосфолипазы — лизофосфолипиды — также влияет на некоторые параметры митохондрий.

На функции митохондрий сАМР может, по-видимому, влиять не только через жирные кислоты, но и более прямо. Как было недавно показано Роделем и соавт. [1262], на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий дрожжей имеется белок, связывающий сАМР. Он представляет собой полипептид массой 45 кДа, синтезирующийся на цитоплазматических рибосомах. Его сродство к сАМР очень велико ($K_d = 10^{-9}$ М). Можно предположить, что этот белок служит специфическим рецептором, ответственным за описанное ранее действие сАМР, добавленного к клеткам дрожжей, а именно стимуляцию синтеза митохондриями субъединиц I—III цитохромоксидазы и ускорение дыхания.

Нет сомнений, что ион H^+ может быть также использован в качестве вторичного посредника. Любой фермент имеет свой оптимум pH. Проблема состоит в том, чтобы измерить реальную величину pH в отдельных отсеках митохондрий и систематически исследовать действие сдвигов pH в этих отсеках на митохондриальные ферменты, портеры, состояние мембраны и т. д.

Уже совершенно очевидно, что pH-регуляция очень важна при работе H^+ —АТФазы внешней мембраны клеток растений и грибов. Как отмечалось в разделе 4.3, этот фермент начинает активно откачивать ионы H^+ из цитоплазмы во внешнюю среду, если возрастает внутриклеточная концентрация H^+ . Действие растительных гормонов ауксинов, по всей вероятности, связано с закислением цитоплазмы, вызывающим активацию H^+ —АТФазы и, как следствие, повышение $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки [320, 631]. Оба эффекта — закисление цитоплазмы и рост $\Delta\psi$ —

удается имитировать в отсутствие ауксинов добавкой ацетата — проникающей слабой кислоты, которая, как и ауксины, вызывает удлинение клеток стеблей проростков и колеоптилей [319, 631].

В некоторых случаях показано, что гормон влияет на фермент без участия вторичных посредников. В этой связи можно отметить торможение NADH — CoQ -редуктазы стероидными гормонами [1460]. Другой гормон, по-видимому, каким-то образом прямо влияющий на митохондрии, — это тироксин. Уже давно выяснено, что тиреоидные гормоны играют роль в окислительном обмене. Однако мысль, что они непосредственно влияют на дыхание митохондрий [118], была оставлена в 1960-е годы, когда выяснилось, что тироксин взаимодействует с аппаратом синтеза информационной РНК в ядре [403].

Впоследствии было, однако, показано, что тиреоидные гормоны специфически связываются не только с ядром, но и с другими частями клеток. Так, трийодтиронин, введенный *in vivo* в физиологических количествах гипотиреоидным животным, очень быстро и специфически захватывается митохондриями [1160]. $1 \cdot 10^{-6}$ М трийодтиронин, добавленный к гомогенату печени тиреоидэктомизированных крыс, нормализует скорость окислительного фосфорилирования, сниженную в отсутствие гормона. На изолированных митохондриях трийодтиронин был неэффективен. Быть может, в данном случае необходимо было участие как митохондриальных, так и немитохондриальных рецепторов [403].

К сожалению, пока еще не представляется возможным дать цельную картину регуляции ΔpH в эукариотической клетке из-за большого разнообразия взаимодействующих регуляторных механизмов.

6.1.5. Контроль ΔpH у бактерий

Как уже отмечалось, многие бактерии располагают параллельными электрон-транспортными путями, одни из которых сопряжены с накоплением энергии, а другие — нет. Кроме того, свободное и сопряженное окисление могут быть последовательно включены в одну и ту же дыхательную цепь. Что касается возможности «полезного разобщения», то эта проблема никогда не исследовалась применительно к бактериям.

Интересный пример механизма, поддерживающего высокую ΔpH по принципу саморегуляции, был выявлен в опытах с подвижными бактериями. Было показано, что искусственно вызванные изменения ΔpH воспринимаются бактерией как сигнал, регулирующий ее движение [1034]. Так, добавка разобщителя или истощение кислорода служит репеллентным сигналом, вызывающим изменение направления движения бактерии. Соответственно добавление O_2 оказывается аттрактантным стимулом, благоприят-

ным для линейного движения [151, 610a, b, 910, 911, 1034, 1370, 1495]. Было отмечено, что влияние кислорода на поведение бактерий (аэротаксис) проявляется лишь тогда, когда концентрация O_2 в среде влияет на $\Delta\bar{p}H$ [185].

Простейшее объяснение этих данных состоит в том, что бактерия располагает устройством, которое измеряет $\Delta\bar{p}H$ и посылает соответствующий сигнал флагеллярному мотору, регулируя таким способом направление вращения жгутика: направление изменяется на противоположное, если $\Delta\bar{p}H$ снижается, и сохраняется неизменным, если она растет. В результате клетка движется туда, где она может поддерживать более высокую $\Delta\bar{p}H$ [610a]. Гипотетический механизм подобного типа, названный протометром, позволяет интегрировать множество благоприятных и неблагоприятных воздействий, отражающихся на энергетическом состоянии мембран.

Есть ряд сведений, что роль протометра может играть какой-то компонент дыхательной цепи на уровне Q-цикла или особая редокс-система, находящаяся в $\Delta\bar{p}H$ -зависимом равновесии с Q-циклом [610b]. Один из вариантов — $\Delta\bar{p}H$ -зависимый обратный перенос электронов от дыхательной цепи к протометру. В рамках такой модели неудивительно, что не только $\Delta\bar{p}H$, но и степень восстановления среднего сегмента дыхательной цепи влияет на «показания» протометра (см., например, [610b]). Однако вряд ли истинной функцией протометра служит измерение, скажем, восстановленности убихинона. Такое измерение несравненно менее информативно, чем отслеживание уровня $\Delta\bar{p}H$. Например, восстановление убихинона может быть следствием изменения условий как в благоприятную, так и в неблагоприятную сторону (соответственно избыток субстратов дыхания и нехватка кислорода). По-видимому, лишь в искусственно созданных условиях изменение редокс-статуса, а не уровень $\Delta\bar{p}H$ становится фактором, определяющим показания протометра, когда речь идет о гетеротрофных бактериях (см., однако, [610b]).

Ситуация может оказаться иной в случае цианобактерий и хлоропластов. Здесь представляется весьма важным измерение именно редокс-состояния среднего участка электронно-транспортной цепи. Такого рода механизм призван оптимизировать условия для нециклического пути, генерирующего $\Delta\bar{p}H$ и NADPH. Чтобы достичь такого эффекта, активности фотосистем I и II должны быть определенным образом согласованы, как это было впервые показано Эммерсоном и Льюисом [530]. Впоследствии выяснилось, что хлоропласты располагают регуляторным механизмом, согласующим работу двух фотосистем [279, 1083].

Устройство, о котором пошла речь, действует, вероятно, следующим образом. Если фотосистема II работает слишком быстро, это приводит к восстановлению редокс-переносчика (предположительно PQ), включенного между двумя фотосистемами. Такой

эффект каким-то способом активирует протеинкиназу, фосфорилирующую белок, который несет на себе хлорофилл антенны. Названный белок в его нефосфорилированном состоянии локализуется в основном в тилакоидах, упакованных в граны. Фосфорилирование увеличивает отрицательный заряд белков антенны, которые диффундируют из тилакоидов в мембраны стромы, где в основном локализована фотосистема I, которая в итоге получает больше хлорофилла антенны, а стало быть, и больше фотонов, чем фотосистема II. Активация фотосистемы I вызывает окисление PQH₂ и, следовательно, торможение протеинкиназы. Непрерывно действующая протеинфосфатаза дефосфорилирует белок антенны и прекращает его дальнейшую утечку из тилакоидов в ламеллы стромы. Таким образом, оптимизируется соотношение активностей двух фотосистем (см. обзор: [1446]).

Интересной проблемой является соотношение этой системы (ее можно назвать редокс-метром) и протометра, который ответствен за аттрактантное действие света на цианобактерии [44].

Как уже обсуждалось выше (раздел 3.5.8.2), протометр участвует в реализации аттрактантного действия сильного красного света у галобактерий [716]. Такое повышение должно быть особенно сильным при выключенных дыхании и H^+ -АТФазе, когда бактериородопсин становится единственным $\Delta\bar{p}H$ -генератором. Что же касается аттрактантного эффекта слабого красного света, а также репеллентного действия синего света, то они реализуются при участии специализированных фотометрических механизмов, не имеющих отношения к $\Delta\bar{p}H$ [228, 275]. Роль фотометров, по всей видимости, играют сенсорный родопсин и фобородопсин.

М. Ю. Шерман в нашей группе [144, 1367] исследовал возможность того, что протометр, а также ряд других сенсорных устройств, регулирующих поведение бактерий, могут быть вовлечены в широкий круг контрольных механизмов, не связанных с таксисом. Автором были сопоставлены следующие два наблюдения: 1) существование корреляции фаз клеточного цикла и концентрации cGMP в клетке [400]; а также снятие посредством cGMP торможения клеточного деления, вызванного cAMP [761]; 2) сопровождающие таксисные ответы изменения концентрации cGMP, которая повышается аттрактантами и понижается репеллентами [761, 260]. Отсюда прямо следует, что аттрактанты должны стимулировать деление, а репелленты — тормозить этот процесс. Такого рода соотношения представляются вполне оправданными с точки зрения клетки. В условиях, когда $\Delta\bar{p}H$ высока и есть избыток субстратов, обладающих, как правило, аттрактантным действием, клетки начнут делиться. В то же время при снижении уровня $\Delta\bar{p}H$, субстратов, O_2 и т. д. или появлении вредных веществ, обладающих репеллентным действием, бактериям надо скорее покинуть зону неблагоприятных условий, а не размножаться в ней.

Данная логика получила подтверждение в опытах, показавших, что аттрактанты действительно стимулируют, а репелленты тормозят деление клеток *E. coli* [145].

Остается неизвестным, может ли бактерия измерять уровень другой конвертируемой энергетической валюты, АТР. Ясно лишь, что действие протометра не требует превращения энергии $\Delta\bar{p}H$ в АТР, поскольку мутанты без H^+ —АТР-синтазы все еще «чувствуют» разобщители как репелленты, а кислород как аттрактант (см. обзор: [1495]). Фактически измерение АТР описано у высших животных, где это вещество оказалось одним из нейротрансмиттеров [629]. Другой пример биологической системы, измеряющей концентрацию адениннуклеотида, был обнаружен у слепня, который высасывает любую жидкость, если в ней есть ADP, принимая ее за кровь [586].

6.2. Транспорт энергии вдоль мембран в форме $\Delta\bar{p}H$

6.2.1. Общие положения

Обычно мембраны рассматривают как структуры, отделяющие цитоплазму от окружающей среды или один отсек клетки от другого. Без сомнения, такое свойство присуще любой биологической мембране. Однако также ясно, что разделительная функция всегда имеет следствием и определенные интегративные эффекты. Например, цитоплазматическая мембрана не только отграничивает цитоплазму от внеклеточной среды, но и объединяет разнообразные внутриклеточные компоненты в единую систему.

Развитие биохимии и цитологии пролило свет на новые и, по-видимому, весьма важные аспекты интегрирующей роли биомембран. Среди них следует указать на передачу энергии вдоль мембранных структур большой протяженности.

Как должно быть ясно из всего предыдущего изложения, $\Delta\bar{p}H$, подобно АТР, служит конвертируемой энергетической «валютой» многих бактерий, растений, грибов, митохондрий и хлоропластов. В гл. 7 будет показано, что роль мембранной формы энергии в цитоплазматической мембране ряда бактерий и во внешней мембране животной клетки играет $\Delta\bar{p}H$.

Обязательное свойство любой «валюты» — ее транспортабельность. Как $\Delta\bar{p}H$, так и $\Delta\bar{p}Na$ отвечают этому требованию. В частности, представляется вполне очевидным, что и $\Delta\bar{p}H$ и $\Delta\bar{p}Na$ — составляющие протонного потенциала, возникнув на той или иной мембранной структуре, немедленно распространяются по мембране во все стороны. Дело в том, что электропроводность сред по обе стороны мембраны очень высока, поскольку эти среды представляют собой водные растворы электролитов. В то же вре-

мя электропроводность самой мембраны очень низка. Это означает, что $\Delta\bar{p}H$, образованная данным $\Delta\bar{p}H$ -генератором, не может избежать быстрой иррадиации по всей поверхности мембраны. То же относится и к $\Delta\bar{p}H$ из-за высокой скорости диффузии H^+ в воде и большой концентрации рН-буферов, еще более увеличивающих эту скорость. Сказанное означает, что $\Delta\bar{p}H$, образованная $\Delta\bar{p}H$ -генератором в определенной области мембраны, может передаваться вдоль мембраны и превращаться в работу в другой области той же мембраны. Основываясь на приведенных выше соображениях, мы выдвинули в 1969—1971 гг. концепцию, согласно которой сопрягающие мембраны могут играть роль электрического кабеля, действующего в пределах клетки или даже на надклеточном уровне [125, 1395]. В настоящей главе мы рассмотрим эту и некоторые другие интегрирующие функции биологических мембран.

6.2.2. Перенос $\Delta\bar{p}H$, образуемой светозависимыми $\Delta\bar{p}H$ -генераторами, вдоль мембран галобактерий и хлоропластов

Как уже отмечалось в разделе 3.5, перенос $\Delta\bar{p}H$ вдоль мембраны должен быть обязательным этапом утилизации световой энергии бактериями *H. halobium*. У этих микроорганизмов более 50% площади цитоплазматической мембраны может быть занято пурпурными бляшками диаметром до 0,5 мкм. Образованная бактериородопсином $\Delta\bar{p}H$ должна использоваться ее потребителями в иных областях мембраны, чем пурпурные бляшки, поскольку других белков, кроме бактериородопсина, в бляшках нет.

По меньшей мере два процесса транспорта энергии вдоль мембран имеются в хлоропластах и цианобактериях. Хорошо известно, что фотоны в основном поглощаются хлорофиллом антенны. Затем энергия электронного возбуждения мигрирует в плоскости мембраны между молекулами хлорофилла антенны, пока не достигнет хлорофилла реакционного центра, количество которого намного меньше количества хлорофилла антенны (см. обзор: [285]).

Перенос энергии вдоль хлоропластной мембраны, но уже в форме $\Delta\bar{p}H$ должен иметь место, когда $\Delta\bar{p}H$, поставляемая фотосистемой II, которая локализована в тилакоидах, используется для синтеза АТР H^+ —АТР-синтазой, сосредоточенной в ламеллах стромы хлоропласта ([159, 1035, 1446]; см. также раздел 5.1.1.9).

6.2.3. Трансклеточный перенос энергии в трихомах цианобактерий

В галобактериях и хлоропластах передача энергии осуществляется на расстояние не более 1 мкм. В то же время транспорт $\Delta\psi$ может быть эффективным на расстояние порядка 1 мм, как это показал расчет потерь, сопровождающих такую передачу энергии (потери рассчитывали по уравнению электрического кабеля) [357, 1406].

Первый пример передачи $\Delta\bar{p}H$ на столь большое расстояние был описан в нашей лаборатории при изучении трихомов нитчатых цианобактерий *Phormidium uncinatum* [79, 357, 1407].

Трихом цианобактерий представляет длинную цепочку соединенных друг с другом клеток. Число клеток может достигать тысячи, а длина трихома — нескольких миллиметров. Есть данные, что клетки, объединенные в трихом, могут быть связаны друг с другом микроплазматесмами — тонкими трубочками, пересекающими межклеточное пространство [607, 1410]. Если микроплазматесмы имеют высокую электропроводность, то $\Delta\psi$, образованная, скажем, вблизи одного конца трихома, может передаваться вдоль всего трихома вплоть до его противоположного конца и там совершать полезную работу.

Чтобы проверить это предположение, мы использовали свет как источник энергии для генерации $\Delta\bar{p}H$ и движение как $\Delta\bar{p}H$ -зависимую работу. Было найдено, что освещение сфокусированным пучком света около 5% трихома на его конце сообщает трихому подвижность в условиях, когда использование темновых источников энергии было исключено. Как показали контрольные опыты, движение трихома требует энергизации на протяжении не менее $1/3$ его длины. Сопоставление этих фактов свидетельствовало о трансклеточной передаче энергии $\Delta\bar{p}H$ вдоль трихомов [357, 1407]. Впоследствии такое заключение было прямо подтверждено двумя независимыми методами.

1. За энергизацией $\Delta\psi$ следили по накоплению флюоресцирующего проникающего катиона этилродамина. Как выяснилось, освещение 5% трихома вызывает генерацию $\Delta\psi$ во всех составляющих трихом клетках [1359].

2. Передача $\Delta\psi$ вдоль трихома, освещенного тонким световым пучком, была измерена классическим электрофизиологическим способом. Получилось хорошее соответствие амплитуд $\Delta\psi$, кинетики ее распространения по длине трихома и т. д. и тех же параметров, рассчитанных, исходя из предположения о кабельных свойствах трихома [357, 1406].

Вывод о кабельных свойствах трихомов цианобактерий можно экстраполировать на ткани растений, в которых клетки соеди-

нены между собой плазматесмами, хорошо проницаемыми для ионов, в том числе для H^+ . Возможное значение трансклеточной передачи $\Delta\bar{p}H$ для растительных организмов — интересный предмет будущих исследований.

6.2.4. Структура и свойства нитчатых митохондрий и митохондриального ретикулула

6.2.4.1. Догма о мелких митохондриях

В переводе с греческого митохондрия означает нить-зерно. Это название было предложено цитологами, использовавшими световой микроскоп. Первые исследователи митохондрий всегда подчеркивали, что данные органеллы существуют в двух основных формах: 1) нитчатой и 2) сферической или эллипсоидной.

С введением электронной микроскопии и техники тонких срезов подобное мнение изменилось таким образом, что нитчатые митохондрии стали рассматриваться как весьма редкое исключение, в то время как сферическая форма была принята канонической. Подобное изменение взгляда на митохондрии оказалось следствием того обстоятельства, что микроскопист, рассматривающий одиночную электронную микрофотографию, по существу, имеет дело с двумерным изображением клетки. На одиночном срезе клубок ниток можно ошибочно принять за набор мелких зерен. Истинную картину можно получить, только реконструировав структуру по многим серийным срезам, прошедшим строго параллельно друг другу.

Новая догма о размере и форме митохондрий приобрела особую популярность среди молодого поколения биохимиков, никогда не видевших толком митохондрии в световой микроскоп. Чтобы наблюдать митохондрии этим старым способом, нужна известная сноровка, поскольку они находятся на грани разрешающей способности световой микроскопии. Проще было поверить на слово электронным микроскопистам, развившим новый физический метод с несравнимо большим разрешением.

Ясно, что передача $\Delta\bar{p}H$, ограниченная отдельной мелкой митохондрией сферической формы, не может служить механизмом транспорта энергии в масштабах клетки. Но если все же старые морфологи были правы, помещая «митос» на первое место в названии этих органелл, и митохондрии обычно (или хотя бы иногда) имеют вид длинных нитей, то их функция в качестве внутриклеточного протонного кабеля представляется вполне реальной.

6.2.4.2. Гигантские митохондрии и *Reticulum mitochondriale*

Три методических подхода поколебали догму о мелких митохондриях: 1) реконструкция трехмерной структуры клетки по сериям тонких срезов, 2) высоковольтная электронная микроскопия, дающая возможность увеличить толщину исследуемого препарата, и 3) окрашивание митохондрий флюоресцирующими проникающими катионами, что позволило вернуться к прижизненному изучению клетки под световым микроскопом.

Метод серийных срезов был применен прежде всего в работах на одноклеточных эукариотах. Уже самые первые исследования этих объектов выявили очень крупный размер и сложное строение митохондрий. Например, Бертон и Мур [334], работая с *Polytomella agilis*, обнаружили в клетке этого простейшего из группы жгутиковых всего одну (!) митохондрию, выглядевшую как перфорированная сфера, располагающаяся сразу под внешней клеточной мембраной. Цитоплазма и ядро лежали внутри этой сферы как в авоське (рис. 99).

Одинокрая гигантская митохондрия была описана в клетках некоторых дрожжей [90а, 434, 732, 796], одноклеточных водорослей *Micromonas* [983] и *Chlorella* [196], зооспорах *Freidmannia* [1017], а также в клетках *Leishmania donovani* [1281], *Blastocladiella emersonii* [308], *Pleurochristis carterae* [235], *Pyramimonas gelidicola* и других *Prasinophyceae* [1010, 1115], *Cryptophyceae* [1299] и *Prymnesiophyceae* [641]. Несколько очень крупных сетчатых митохондрий, иногда объединяющихся в одну, было обнаружено у хламидомонад [186, 1336, 1518, 1580], *Euglena gracilis* [340, 919, 1142], трипаносом [1174, 1389, 1451] и некоторых грибов [608]. Нитевидные митохондрии длиной около 10 мкм найдены в экзокринных клетках поджелудочной железы [921]. Сперматозоиды содержат цепь длинных митохондрий, состыкованных конец в конец [201, 921, 1209]. Брандт и соавт. [297] выявили в печени два типа митохондрий: мелкие сферические и крупные разветвленные. Подобная картина наблюдается в клетках асцитного рака [1237] и у водоросли *Polytoma rapillarum* [592, 1434]. В последнем случае было проанализировано 228 параллельных срезов через клетку водоросли. Оказалось, что клетка содержит 246 отдельных мелких сферических митохондрий, две крупные и разветвленные и еще одну очень большую, образующую полый перфорированный шар.

Одним из наиболее интересных объектов для изучения возможных механизмов передачи энергии являются клетки мышечной ткани. Многоядерные клетки мышц (мышечные волокна) достигают огромных размеров. Их энергетические потребности чрезвычайно высоки. В тяжело работающей мышце должны возникать градиенты кислорода и субстратов между периферией и серд-

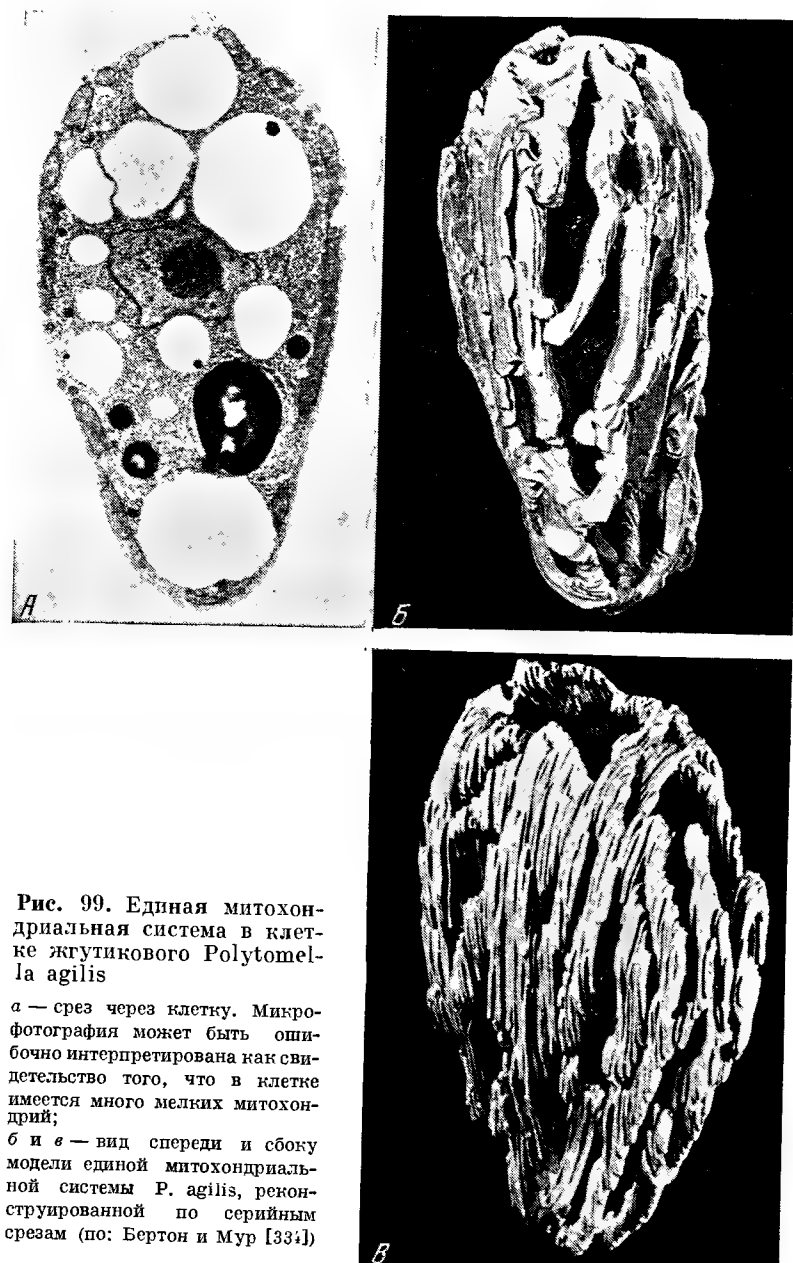


Рис. 99. Единая митохондриальная система в клетке жгутикового *Polytomella agilis*

а — срез через клетку. Микрофотография может быть ошибочно интерпретирована как свидетельство того, что в клетке имеется много мелких митохондрий;

б и в — вид спереди и сбоку модели единой митохондриальной системы *P. agilis*, реконструированной по серийным срезам (по: Бертон и Мур [334])

цевинной клетки, что ограничивает объем выполняемой работы. Передача $\Delta\mu\text{H}$ от краев мышечной клетки к ее центру могла бы решить проблему. Но для этого мышечные митохондрии должны быть очень велики по размеру.

В летательных мышцах насекомых были обнаружены митохондрии, имеющие вид пластин, тянущихся от края к центру клетки. Их длина около 10 мкм, т. е. того же порядка, что радиус мышечного волокна.

Первые указания на то, что в мышцах высших животных митохондрии могут достигать значительных размеров, были получены в 1960-е годы Бубенцером [323, 324], Готье и Падикулой [599, 600] и Огатой и Муратой [1130] (см. также: [1237]). Авторы исследовали одиночные срезы соответственно крысиной диафрагмы, *Musculus semitendinosus* и межреберной мышцы человека.

В нашей лаборатории Л. Е. Бакеева и Ю. С. Ченцов [13, 204] предприняли систематическое исследование серийных срезов мышцы диафрагмы крысы. Было найдено, что митохондрии в этой ткани имеют вид сети, пронизывающей мышечное волокно в изотропной области, а именно вблизи Z-дисков. Сети связаны между собой колоннами, расположенными параллельно миофибриллам. Кроме того, имеются ветви, связывающие сети с митохондриальными кластерами по краям мышечного волокна. Вся эта система, названная нами митохондриальным ретикулумом (*Reticulum mitochondriale*), характерна для диафрагмы взрослых животных. Ее нет в диафрагме крысиных эмбрионов и новорожденных крысят [204]. Дальнейшее исследование [14, 205] выявило динамику постэмбрионального развития митохондриального ретикулума. Этот процесс, как оказалось, занимает около 2 мес. после рождения животного.

Рис. 100—102 иллюстрируют основные этапы становления митохондриального ретикулума в онтогенезе. Видно, что количество митохондрий в диафрагме за день-два до рождения сравнительно мало. Они образуют отдельные колонны, вытянутые вдоль актомиозиновых нитей. Никаких связей между колоннами не обнаруживается (см. рис. 100, а, б). У однодневного крысенка митохондрий становится больше. Они все еще имеют вид колонн, ветвление отсутствует. Иногда, однако, в местах соприкосновения двух колонн удается обнаружить особым образом устроенные контакты. Каждый такой контакт состоит из четырех мембран (по две от каждой из вступивших во взаимодействие митохондрий). На поперечном срезе контакт выглядит как черная перегородка (см. рис. 100, в). (Подробнее о межмитохондриальных контактах будет сказано ниже.)

К месячному возрасту количество митохондриального материала в диафрагме резко увеличивается. От одной колонны к другой протягиваются отростки, так что над и под Z-диском образуется сеть. Сами колонны становятся длиннее. Теперь они все

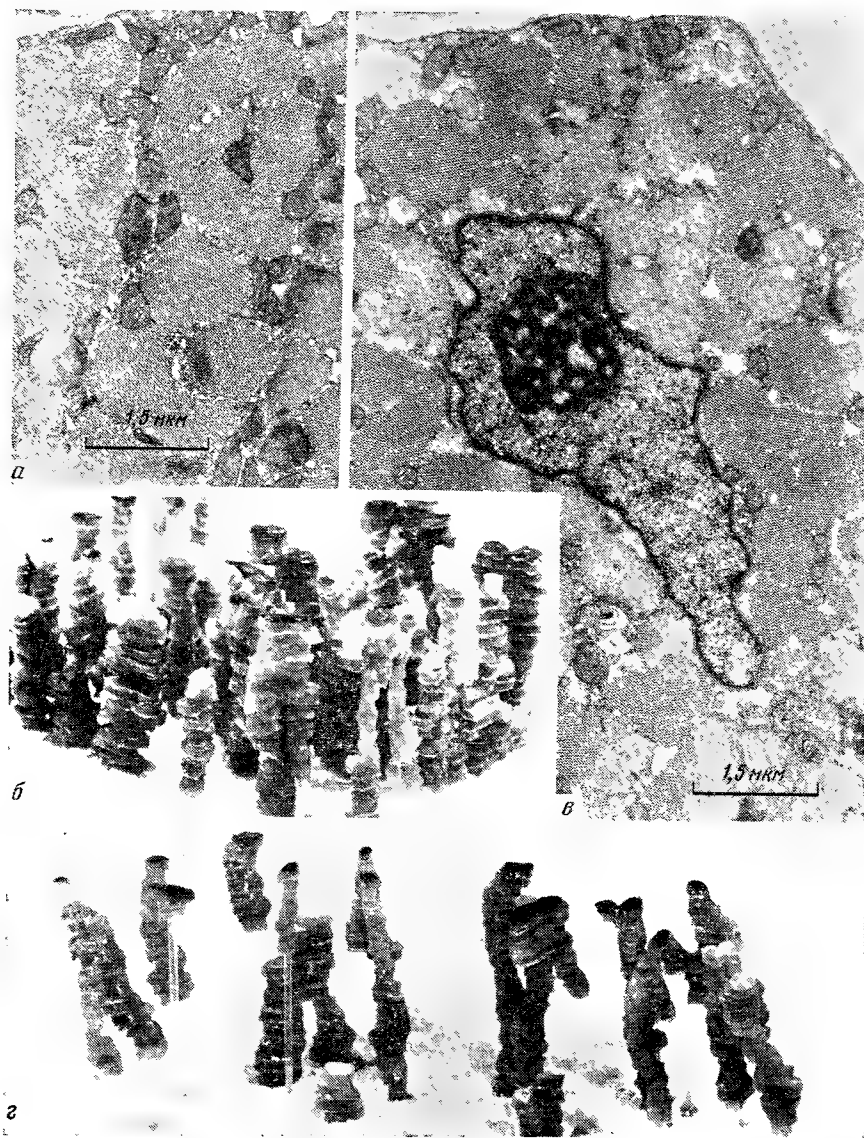


Рис. 100. Митохондрии в мышце диафрагмы двухдневного крысенка (а, б) и крысиного эмбриона за 1—2 дня до рождения (в, г)

а, в — поперечные срезы; б, г — вид сбоку на восковую модель митохондрий, полученную путем реконструкции соответственно 31 и 19 поперечных срезов. На рис. а (в центре) виден митохондриальный контакт (по: Бакеева и др. [205])



Рис. 101. Митохондриальный ретикулум в диафрагме одномесячного крысенка

a — поперечный срез, *б* — вид сбоку на модель, сделанную по 45 срезам, *в* — схема, иллюстрирующая структуру митохондриального ретикулума в мышце диафрагмы (по: Бакеева и др. [2051])

чаще пересекают не только весь саркомер, но и один или два Z-диска, связывая между собой сети соседних саркомеров. Реконструкция митохондриального каркаса в диафрагме двухмесячного животного (см. рис. 102) выявила наличие очень длинных тяжей, идущих параллельно Z-дискам. Иногда на одном и том же срезе можно было проследить тяж, начинающийся на самом краю мышечной клетки и теряющийся где-то в ее центральной части. Гребни, образованные внутренней митохондриальной мембраной, как правило, вытянуты вдоль длинной оси тяжа. Тяжи всегда располагаются вблизи Z-диска. По мере удаления от него в глубь саркомера тяжи постепенно истончаются, образуя что-то наподобие кия.

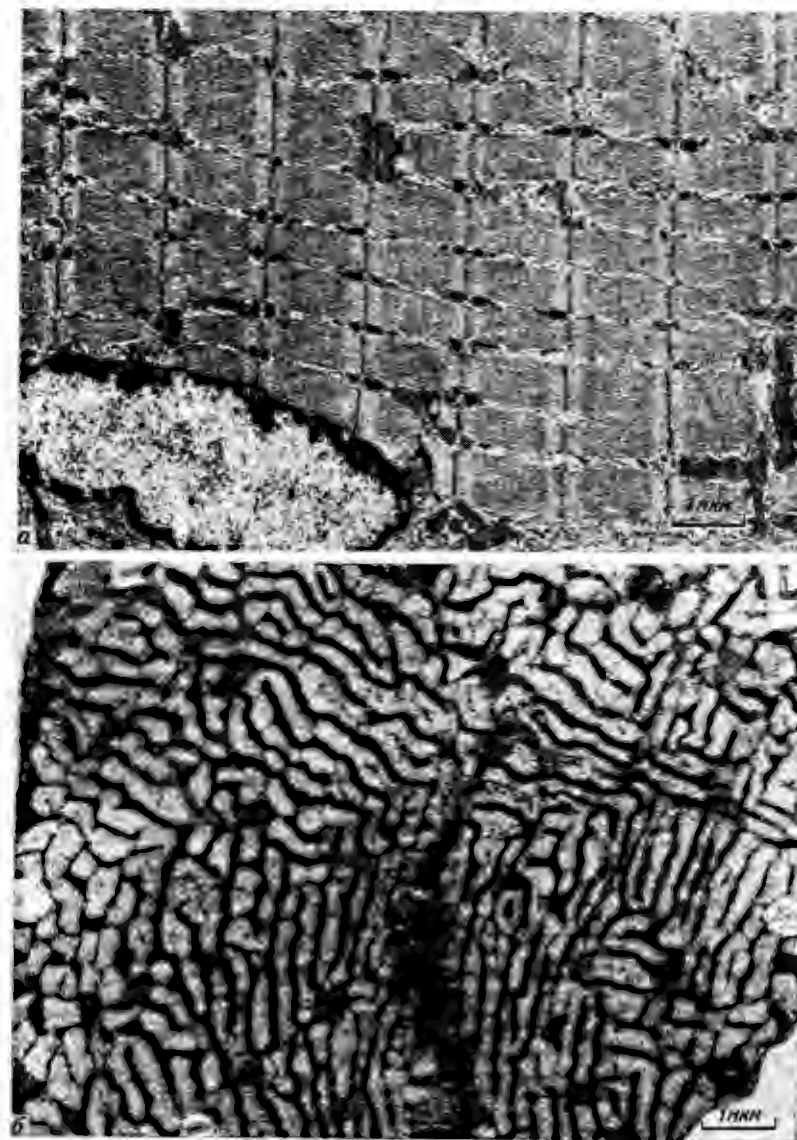


Рис. 102. Митохондриальный ретикулум в диафрагме двухмесячной крысы
a — продольный срез, *б* — поперечный срез через изотропную область (по: Бакеева и др. [2051])

Тот факт, что митохондриальный ретикулум отсутствует в практически бездействующей диафрагме эмбриона и формируется после рождения параллельно становлению сократительной функции этой мышцы, указывает на функциональную значимость описываемой структуры. Онтогенез митохондриального ретикулума напоминает агрегацию конец в конец митохондрий сперматид при их созревании в сперматозоиды [201, 1209]. Подобная агрегация описана и в некоторых других тканях, поставленных в условия энергетического дефицита (гипоксия, гипертиреозидизм и т. д., см., например, [143, 1406]). Этот эффект можно объяснить попыткой клетки объединить усилия отдельных митохондрий, когда их некоординированная работа уже не обеспечивает нужную скорость выработки энергии. Что же касается такой ткани, как мышца, которая должна постоянно быть готова к проявлению максимальной работоспособности, то здесь митохондриальный ретикулум у взрослого организма есть всегда.

Следующее указание на функциональную значимость митохондриального ретикулума в мышце было получено при сравнении красных и белых мышечных волокон. Оказалось, что трехмерный ретикулум обнаруживается только в красных волокнах, где, как известно, вклад дыхания в энергообеспечение работы особенно велик [1131].

Важен вопрос: какова тонкая структура ретикулума? Он может быть устроен двумя принципиально разными способами: либо одна гигантская митохондрия с едиными внешней и внутренней мембранами, либо множество мелких митохондрий, состыкованных конец в конец. Промежуточный вариант состоит в том, что общая внешняя мембрана объединяет много митопластов, каждый из которых окружен своей собственной внутренней мембраной.

Как уже отмечалось выше, иногда составляющие ретикулум митохондриальные филаменты образуют, соприкасаясь, особые контактные зоны. Эта структура, открытая в нашей лаборатории Л. Е. Бакеевой и др. [204] при исследовании мышцы диафрагмы, затем была детально изучена в той же группе на примере сердечной мышцы, где митохондриальные контакты особенно многочисленны [15, 206]. Оказалось, что митохондрии в этой ткани также образуют трехмерную систему, но вместо сети из тонких ветвящихся трубчатых митохондриальных тяжей, описанных в мышце диафрагмы и в скелетных мышцах, в сердце имеется множество толстых эллиптической формы митохондрий с малым количеством отростков. Все они связаны друг с другом контактами (рис. 103).

Зона контакта представляет собой диск диаметром от 0,1 до 1 мкм. В этой зоне как мембраны, так и межмембранное пространство характеризуются повышенной электронной плотностью. Две внешние мембраны контактирующих митохондрий макси-

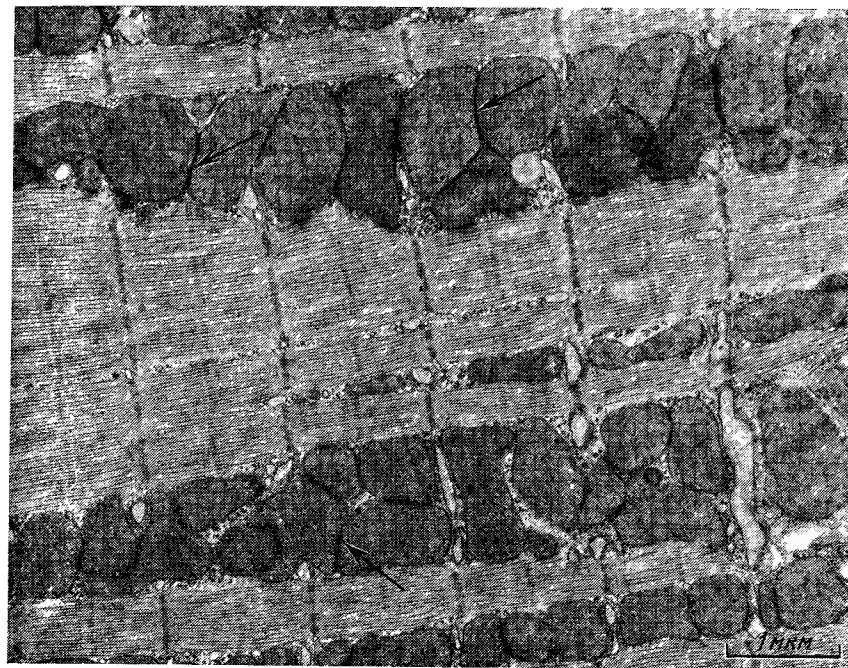


Рис. 103. Продольный срез миокардиоцита

Стрелками показаны митохондриальные контакты (по: Бакеева и др. [206])

мально сближены друг с другом, наподобие того, как это описано для плотных контактов внешних клеточных мембран (рис. 104 и 105). Каждая митохондрия связана с соседями несколькими такими контактами, обнаруживаемыми как в сократившихся, так и в расслабленных миокардиоцитах. В то же время контакты отсутствуют в сердце эмбриона.

Еще более сложная контактная структура была найдена в зоне нексуса (межклеточного щелевого контакта). Иногда можно было видеть, что митохондрии, локализованные в двух соседних миокардиоцитах, плотно прилегают к внешней клеточной мембране в области щелевого контакта. В результате образуется шестимембранный контакт, составленный из двух клеточных и четырех митохондриальных мембран (рис. 106). Недавно митохондриальные контакты были обнаружены в сердечной мышце беспозвоночных [1118].

Контакты митохондриальной и внешней клеточной мембран описаны не только в сердце, но и в некоторых других тканях.

Как было показано недавно В. Ф. Машанским и его коллегами [90], митохондрии в нейроне переднего мозга ящерицы образуют

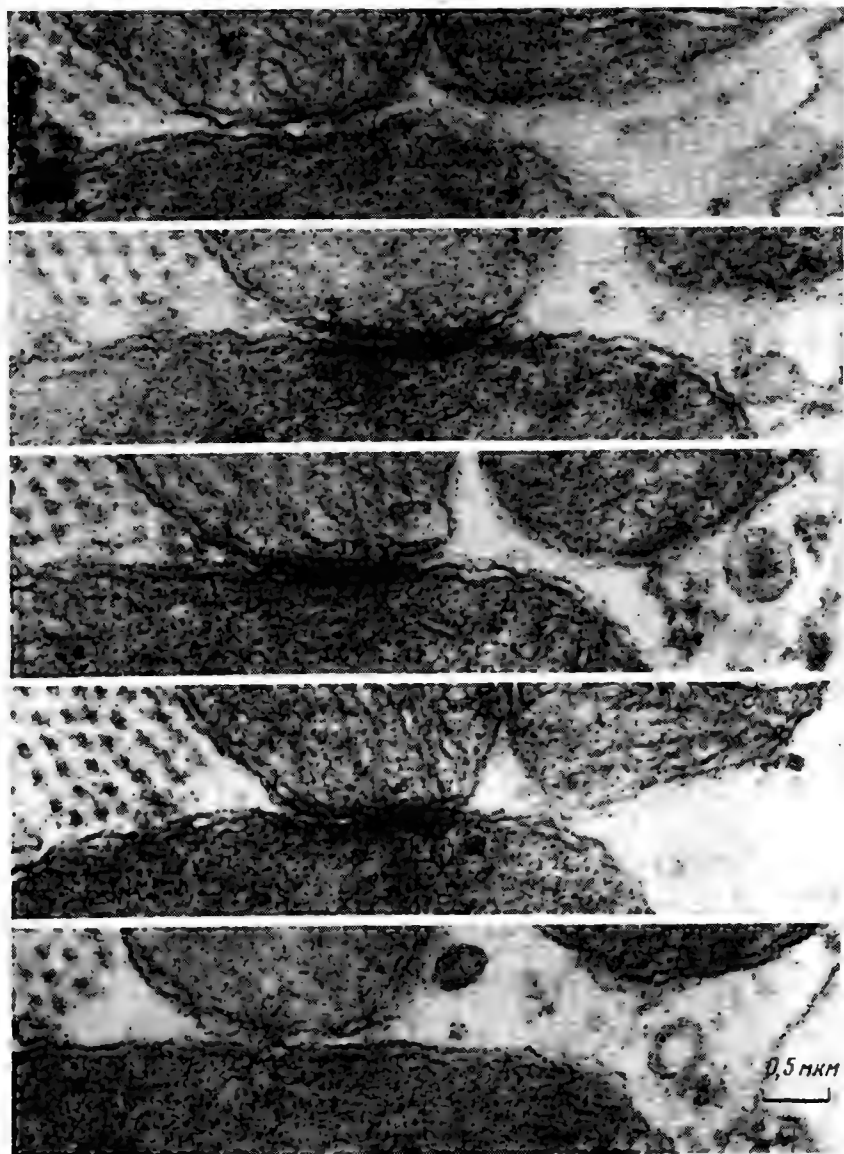


Рис. 104. Серийные срезы через область митохондриального контакта в миокардиоците (по: Бакеева и др. [206])

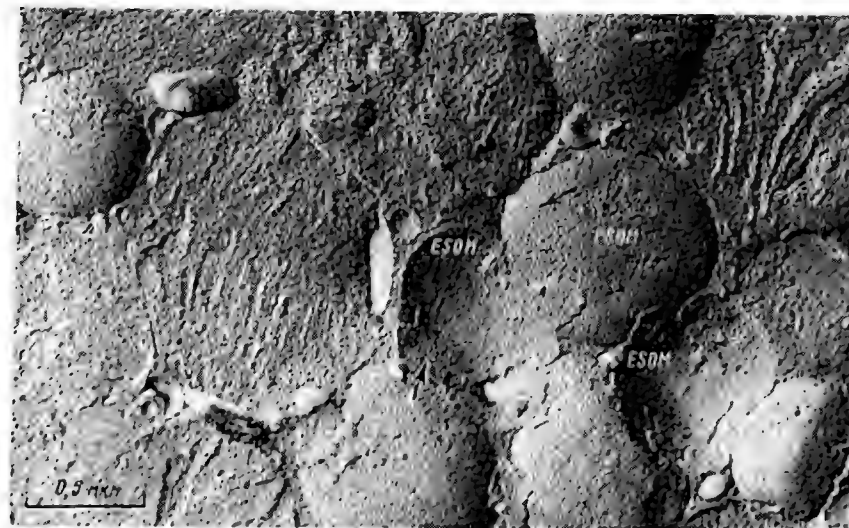


Рис. 105. Микрофотография области миокардиоцита, богатой митохондриями

Метод замораживания и скалывания. ESOM и PSOM — внешняя и внутренняя поверхности внешней мембраны митохондрий. Стрелки показывают область митохондриального контакта. Видно, что концентрация внутримембранных частиц в области контакта очень высока, в то время как области тех же митохондрий, удаленные от контакта, почти не содержат таких частиц (по: Бакеева и др. [15])

контакты не только друг с другом, но и с плазматической мембраной клетки в активных зонах синапсов вблизи перехватов Ранье (см. обзор: [571]).

6.2.4.3. Нитевидные митохондрии

Если изучаемый объект имеет не столь высокую электронную плотность, как мышечное волокно, истинные форма и размер митохондрий могут быть просто выявлены посредством высоковольтной электронной микроскопии. Такого рода исследования обнаружили длинные нитевидные митохондрии в клетках самых различных типов. Один из примеров приведен на рис. 107.

Однако указанный метод имеет два существенных ограничения. Во-первых, он не позволяет наблюдать митохондриальные контакты. Поэтому не удастся ответить на вопрос, имеем ли мы дело с одной протяженной митохондрией или со многими органеллами, состыкованными друг с другом. Во-вторых, подобно любой другой методике, использующей электронный микроскоп, высоковольтная микроскопия имеет дело с фиксированным мате-

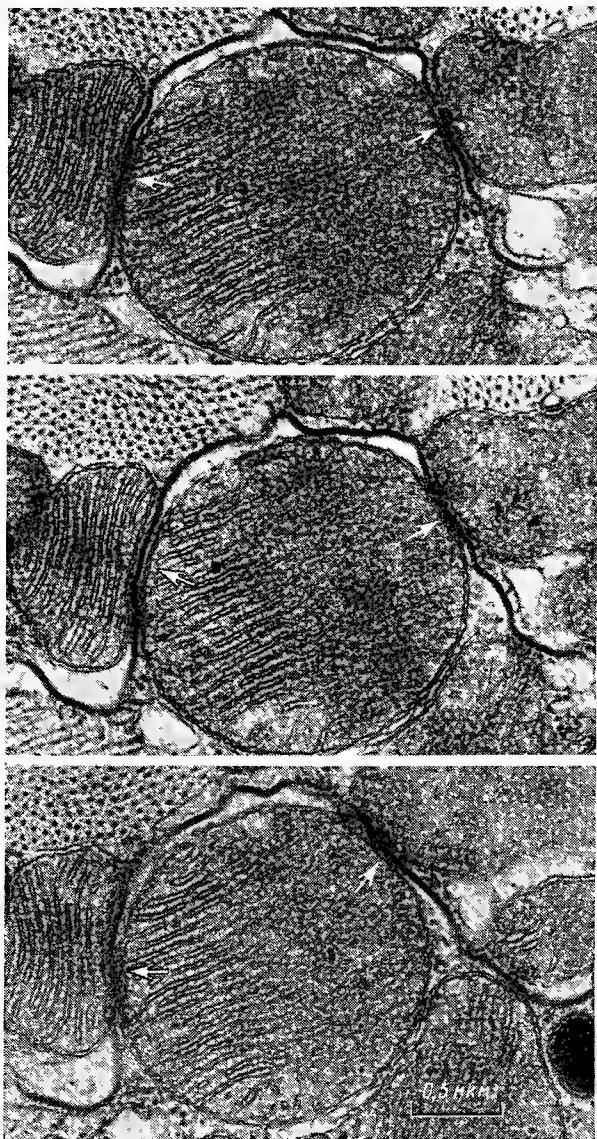


Рис. 106. Серийные срезы через область щетевых контактов миокардиоцита. Стрелка указывает на шестимембранный контакт, образованный двумя внешними клеточными мембранами и четырьмя мембранами двух митохондрий, принадлежащих разным клеткам (по: Бакеева и др. [206])

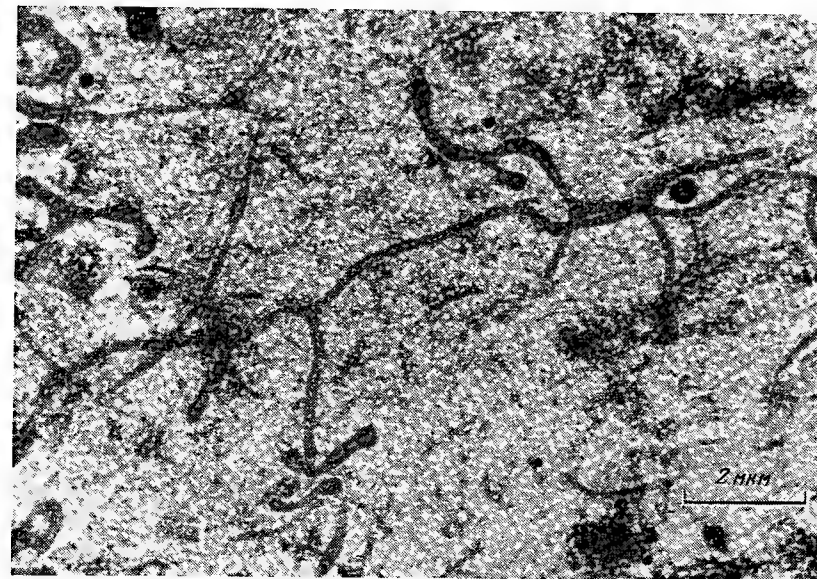


Рис. 107. Нитчатая митохондрия в клетке культуры почки (PtK₁) под высоковольтным микроскопом (фотография И. А. Воробьева)

риалом, что не позволяет прямо следить за функционированием митохондрий.

Чтобы преодолеть последнее затруднение, мы решили на время вернуться к световому микроскопу. Этим методом, в принципе, можно увидеть митохондрии в живой клетке, но тонкие митохондриальные филаменты и сети часто ускользают от наблюдения из-за низкого разрешения микроскопии в проходящем свете. Такого рода ограничение снимается, если работать не с поглощением, а с эмиссией света. Когда эмиссия достаточно интенсивна, источник света можно увидеть в темноте, даже если его не удается наблюдать как тело, задерживающее свет.

Итак, проблема состояла в том, как заставить митохондрии светиться. Для достижения этой цели мы применили тот же подход, что ранее помог нам обнаружить генерацию $\Delta\bar{p}H$ на митохондриальной мембране, а именно проникающие синтетические катионы. Единственная разница была в том, что теперь предстояло найти катионы, способные флюоресцировать. Ведь если флюоресцирующий катион распределится между цитозолем клетки и митохондриями в соответствии с $\Delta\bar{p}H$, то в митохондриальном матриксе его концентрация может быть до 10^4 раз большей, чем в цитозоле. И тогда свечение ранее невидимых нитчатых митохондрий можно будет наблюдать под флюоресцентным микроскопом.

В поисках флюоресцирующих проникающих катионов мы обратили свое внимание на родамины. Эти соединения, во-первых, положительно заряжены, во-вторых, довольно гидрофобны и, в-третьих, флюоресцируют с высоким квантовым выходом. Кроме того, из работ Йоханнеса [777], выполненных еще в 1941 г. посредством светового микроскопа, было известно, что определенные производные родамина специфически окрашивают митохондрии в живой клетке.

Опыты, проведенные в нашей группе И. И. Севериной [95, 1359], показали, что этилродамин, добавленный в растворы, омывающие плоскую фосфолипидную мембрану, создает диффузионный потенциал, величина которого соответствует расчетной по уравнению Нернста. Это означало, что этилродамин обладает свойствами проникающего катиона. В других опытах, поставленных в нашей группе Д. Б. Зоровым, этилродамин был использован для выявления митохондриального ретикулума в мышце диафрагмы. К сожалению, этот объект оказался далеко не лучшим для налаживания нового метода из-за большого светорассеяния и малого диаметра митохондриальных тяжей, образующих сеть.

Более счастливыми оказались Чен и сотр., занявшиеся этой проблемой чисто случайно. Они обнаружили, что обработка клеток фибробластов в культуре продажным препаратом антители, конъюгированных с родамином В, выявляет внутри клетки как-то «змеевидные структуры», которые впоследствии удалось идентифицировать как митохондрии [1572]. Как выяснилось в дальнейшем, окрашивание вызывал не сам конъюгат, а содержащаяся в нем примесь свободного родамина В [374]. Систематическое исследование обнаруженного феномена показало, что родамины 3В, 6G и 123, а также другие флюоресцирующие гидрофобные катионы, так же как сафранин О и цианиновые красители, добавленные к живым клеткам, избирательно накапливаются митохондриями, придавая им способность флюоресцировать. Разобщители или валиномицин плюс K^+ гасят свечение митохондрий. Таким образом отвечали не только фибробласты, но и клетки первичной культуры миокардиоцитов и эпителии мочевого пузыря. Особенно удобным оказался родамин 123 (метилродамин) из-за своей низкой токсичности для клетки [779—781]. Впоследствии родамин 123 был широко использован для прижизненного выявления митохондрий в животных и растительных клетках (см. обзоры: [244, 1472], а также [149, 192, 395, 429, 767, 1091, 1490, 1491]). В группе Бернса [1384] удалось наблюдать колебания $\Delta\psi$ в минутной шкале, измеряя флюоресценцию родамина в отдельной митохондрии посредством микрофлюориметра.

Как было найдено в нашей группе И. И. Севериной и Г. В. Мурванидзе, этилродамин может быть использован для измерения $\Delta\psi$ на бактериальной мембране [95, 1359] (см. также: [1491]). Используя быстродействующую микрофлюориметрию, уда-

лось зарегистрировать миллисекундную кинетику изменения $\Delta\psi$ в отдельной клетке цианобактерии [1358].

Главный результат флюоресцентных исследований митохондрий в живой клетке состоит в том, что *in vivo* эти органеллы достаточно часто представляют собой филаменты длиной в десятки микрометров. Иногда митохондриальные филаменты имеют такую большую протяженность, что могут связывать периферию и центр клетки или даже пересекать клетку от края до края. В ряде типов клеток был выявлен митохондриальный ретикулум. Часто в клетке сосуществуют две популяции митохондрий — длинные нитчатые и мелкие овальные. Такая картина была обнаружена, в частности, Д. Б. Зоровым при исследовании первичной культуры фибробластов человека (рис. 108).

Следует отметить, что преимущественная ориентация нитчатых митохондрий вдоль длинной оси клетки (см. рис. 108) исчезает под действием ядов, разрушающих микротрубочки. При этом длина нитей не изменяется. (О специфических связях митохондрий с микротрубочками см.: [679, 1430].) В то же время некоторые лекарственные и другие воздействия *in vivo* могут вызывать фрагментацию длинных митохондрий на мелкие овальные (см., например, [1561]).

Говоря в более общем плане, применение прижизненной флюориметрии митохондрий подтвердило отрывочные наблюдения, сделанные ранее традиционными методами, свидетельствовавшими, что обратимый переход «нить—зерно» есть универсальное свойство этих органелл.

В данной связи можно указать, например, на данные Б. Б. Вартапетяна и др. [1551], показавших методом электронной микроскопии сильное удлинение митохондрий клеток корней растений, помещенных в анаэробные условия.

Фойсснер [570] изучал митохондрию *Nitella flexilis* посредством световой микроскопии и показал превращение митохондрий в филаменты длиной до 30 мкм при торможении фотосинтеза дуроном или снижением интенсивности света, а также при блокировании дыхательной цепи в среднем или конечном сегментах. В то же время торможение $NADH-CoQ$ -редуктазы ротеноном или снятие $\Delta\mu H$ динитрофенолом не влияли на размер митохондрий. Их удлинение предотвращалось при торможении синтеза белка. Примечательно, что только некоторые митохондрии (не более 20% от общего их числа) превращались в нити, как если бы они несли какую-то дополнительную функцию, отличную от той, которая может быть выполнена мелкими митохондриями.

Случай другого рода был описан Танакой и соавт. [1492]. Методом серийных срезов было показано, что при вхождении клеток дрожжей *Candida albicans* в стадию почкования отдельные митохондрии объединяются в одну гигантскую, которая фрагментируется при митозе. Затем (перед цитокинезом) вновь образуется



Рис. 108. Митохондрии, окрашенные этилпиродамином в живой клетке культуры человеческих фибробластов (фотография Д. Б. Зорова)

гигантская митохондрия, впоследствии разделяющаяся на две части.

Образование митохондриальных филаментов в клетках дрожжей *Endomycetes magnusii*, выращиваемых в гипоксических условиях, было отмечено Мейселем и соавт. еще в 1964 г. [90а].

6.2.4.4. Митохондрии как внутриклеточные протонные кабели: доказательство гипотезы

Результаты, изложенные в предыдущем разделе, свидетельствуют о том, что многие клетки эукариот располагают очень длинными митохондриями, иногда объединяющимися в сеть. Протяженные митохондрии часто сосуществуют с популяцией мелких митохондрий, вошедших в учебники в качестве типичного примера митохондриальных структур.

Если нитчатая митохондрия представляет собой континуум как внешней, так и внутренней мембраны, то $\Delta\bar{p}H$ распространяется по всей ее длине. Если же эта нить составлена из многих мелких митохондрий или митопластов, состыкованных конец в конец, то возможны два варианта: 1) митохондриальный филамент подобен трихому цианобактерий, у которых все его составляющие (клетки) соединены друг с другом микроплазматическими, имеющими высокую электропроводность (раздел 6.2.3); 2) между двумя соседними митохондриями нет электрического контакта.

В предыдущем разделе мы уже описали межмитохондриальный контакт — особую структуру, локализованную на стыках двух митохондрий. Проблема состоит в том, проводящий ли это контакт, подобно микроплазматическим цианобактерий либо щелевым контактам внешних мембран животных клеток, или же, напротив, его сопротивление так же высоко, как в других участках внутренней мембраны митохондрий. С точки зрения предполагаемых кабельных свойств длинных митохондрий первый случай идентичен митохондриальному континууму. Во втором случае приходится предполагать, что обмен энергией между соседними митохондриями обеспечивается не диффузией протонов, а диффузией АТФ (или дыхательных субстратов), перемещающихся через область контакта или где-то рядом с ним. Тогда перенос энергии вдоль нитчатой митохондрии можно описать как «смешанную эстафету»: большую часть пути (между двумя контактами) энергия транспортируется по митохондрии в виде $\Delta\bar{p}H$, а небольшие расстояния в области самих контактов покрываются за счет диффузии АТФ [1406].

Очевидное предсказание гипотезы, рассматривающей нитевидную митохондрию в качестве кабеля, состоит в том, что локальное повреждение в любой точке такой митохондрии должно вызывать деэнергизацию по всей ее длине. Это предсказание недавно получило свое прямое подтверждение в нашей группе. В. А. Драчевым был сконструирован специальный прибор, состоящий из лазера и флуоресцентного микроскопа. Используя это устройство, Д. Б. Зоров облучил одиночный митохондриальный филамент в клетке культуры фибробластов человека, прокрашенной этилпиродамином. Облучение производилось сфокусированным пучком лазера, так что диаметр светового пятна был соизмерим с попереч-

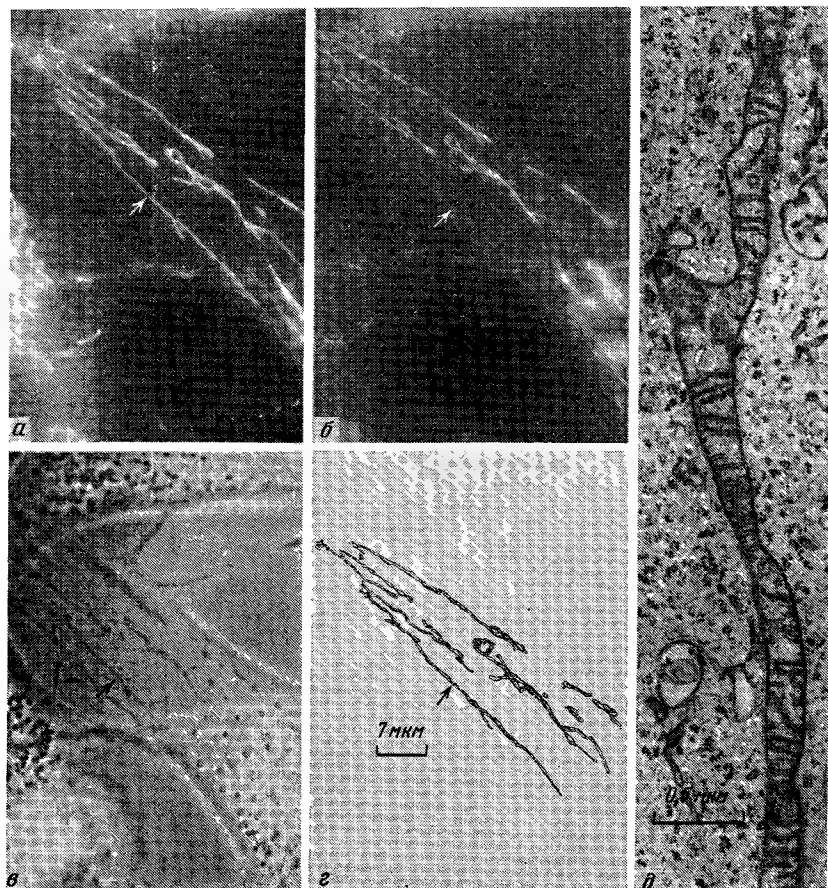


Рис. 109. Сброс $\Delta\Psi$ по всей длине митохондриального филамента, небольшой участок которого был подвергнут облучению сфокусированным лучом лазера

Клетки первичной культуры фибробластов человека окрашены этилпроламином; а — перед лазерным облучением; б—д — после 100 мс облучения; а, б — флуоресцентная микроскопия; в — фазово-контрастная микроскопия; г — вид сверху на модель митохондрий фибробласта, реконструированную по серийным срезам. Стрелки показывают место облучения; д — электронная микроскопия митохондрии, подвергнутой действию лазера (по: Амченкова и др. [4] и Драчев и Зоров [55])

ником филамента. Как видно из рис. 109, такое облучение приводит к исчезновению свечения родамиона по всей длине (40 мкм) филамента. Существенно, что другие митохондриальные филаменты сохраняли свою флуоресценцию. Следовательно, наблюдаемый эффект нельзя объяснить неспецифическим повреждением всей клетки лазером. Фазово-контрастная и электронная микро-

скопия не выявили заметных повреждений в структуре облученной лазером и прекратившей светиться митохондрии [55, 12] (см. рис. 109).

Рис. 110 показывает результаты аналогичного исследования, проведенного на миокардиоцитах. Можно видеть, что облучение одиночной митохондрии вызывает тушение кластера, состоящего из многих митохондрий. В опыте, приведенном на рис. 110, а—д, этот кластер включает митохондрию 1, подвергнутую действию лазера, соседние с ней митохондрии, 2 и 3, а также митохондрии 7—10, 14—19, 23 и 24. Отметим, что некоторые митохондрии, расположенные рядом с облученной, продолжают ярко флуоресцировать (например, 4), в то время как другие, удаленные от места действия лазера на расстояния до 18 мкм (14, 15), полностью гаснут. Электронное микроскопирование обнаружило, что погашение митохондрии связаны с облученной межмитохондриальными контактами. Что касается митохондрий, сохранивших флуоресценцию, то здесь контактов с облученной органеллой найти не удалось (см. рис. 110 г, д).

Как видно из рис. 110, г, погашение митохондрии легко узнать на микрофотографии по гораздо большей электронной плотности. Контрольные опыты показали, что такое же возрастание электронной плотности может наблюдаться при добавлении разобщителей. Оно происходит вследствие резкой конденсации матрикса и в опыте с разобщителем захватывает всю популяцию митохондрий в клетке.

Рис. 110, е—и свидетельствует о том, что два кластера митохондрий, погасших вследствие облучения одного из них, связаны между собой тонкими митохондриальными филаментами. Сочленение кластеров и филаментов осуществляется посредством митохондриальных контактов (на рис. не показаны).

Простейшее объяснение всех этих данных состоит в следующем. В миокардиоците имеется несколько независимых митохондриальных осьминогopodobных кластеров, образованных многими митохондриями. Те из них, которые формируют кластер, соединены друг с другом митохондриальными контактами. Эти контакты характеризуются высокой электропроводностью, напоминая в данном отношении микроплазматесмы цианобактерий [4].

6.2.4.5. Возможный механизм передачи $\Delta\bar{p}H$ вдоль мембран

Если $\Delta\bar{p}H$ находится в форме $\Delta\Psi$, энергия переносится вдоль мембран посредством диффузии подвижных ионов по обе стороны от мембраны. Для внутриклеточных органелл это в основном K^+ , Cl^- и заряженные метаболиты, многие из которых при нейтральном рН являются анионами слабых кислот. В случае внешней клеточной мембраны массовыми ионами снаружи служат Na^+ и Cl^- , а внутри — K^+ , Cl^- и метаболиты. В то же время $\Delta\bar{p}H$ -ге-

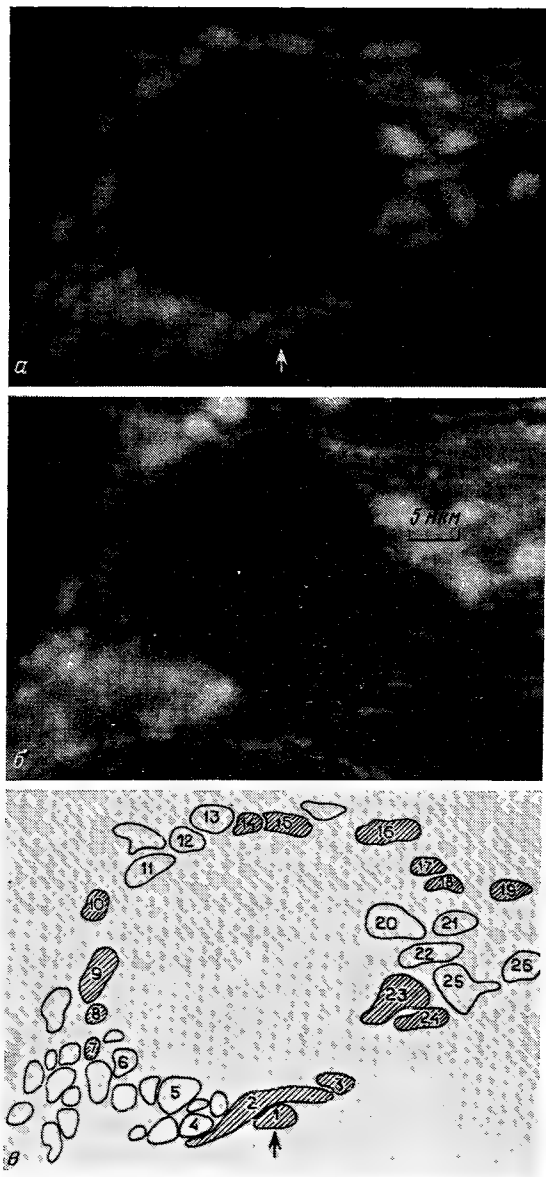
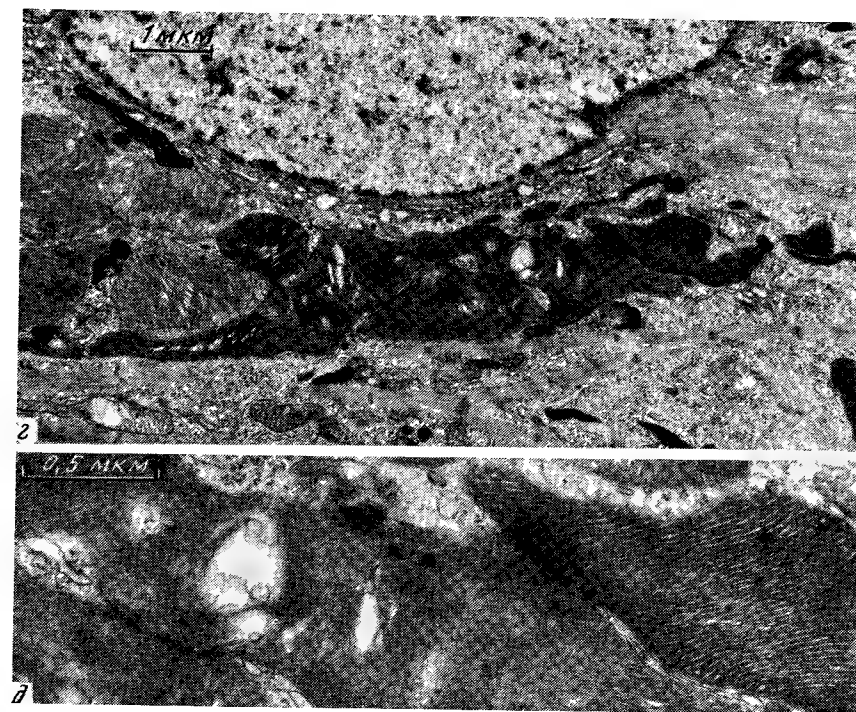


Рис. 110. Сброс $\Delta\Psi$ в кластере сердечных митохондрий, одна из которых облучена лазером

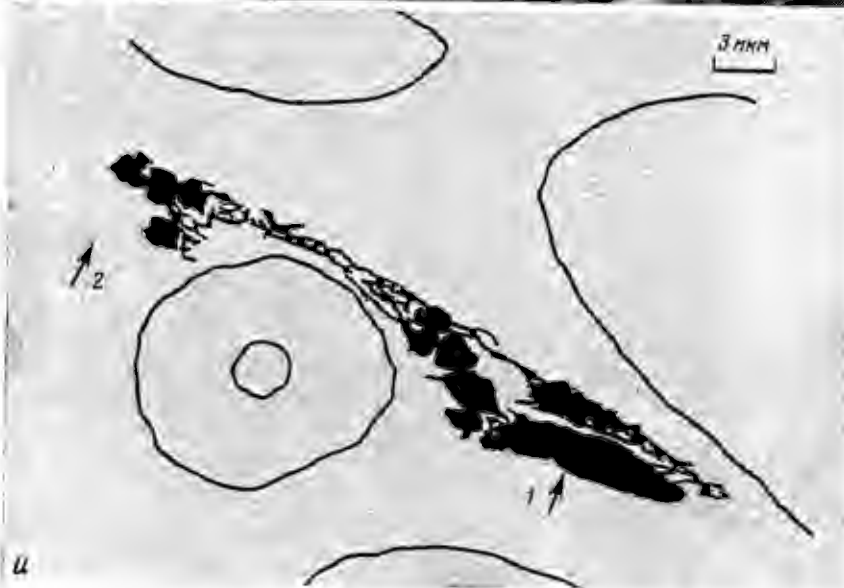
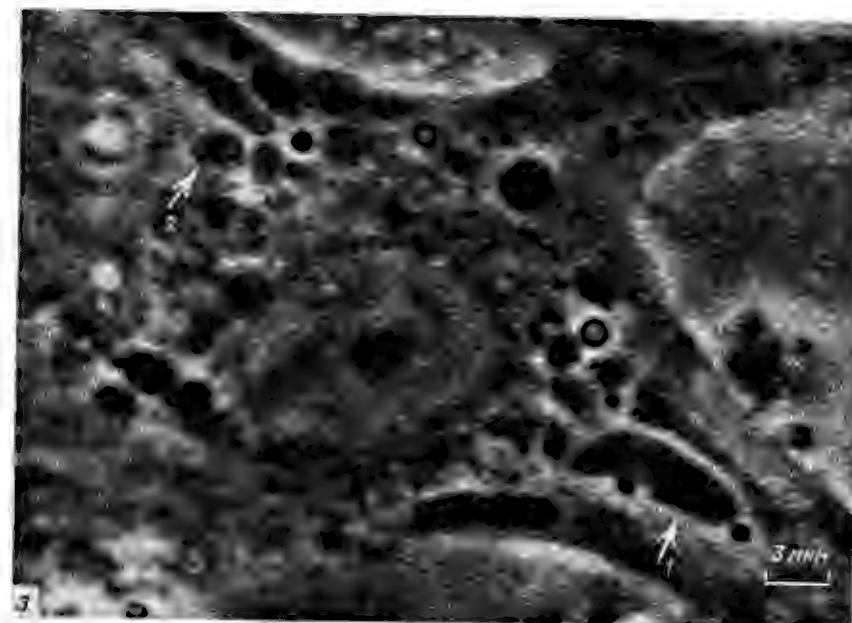
Клетки первичной культуры миокардиоцитов крысы окрашены этилпроламином. Показаны результаты двух опытов (а—д и е—и). а, е, з — до облучения лазером, б, г, ж, и — после такого облучения; а, б, е, ж — флуоресцентная микроскопия; г и д — электронная микроскопия; з — фазово-контрастная микроскопия; е — схема, показывающая, какие именно

нераторы имеют дело не со всеми этими ионами, а с H^+ , концентрация которого гораздо ниже, чем перечисленных выше компонентов. Данное обстоятельство может приводить к возникновению градиентов рН вдоль митохондриальных тяжей.

Такой эффект иллюстрируется рис. 111, где показан предполагаемый механизм переноса энергии вдоль витевидной митохондрии. Согласно схеме, $\Delta\bar{p}H$ генерируется за счет дыхания, происходящего вблизи границы клетки, где концентрация субстратов и кислорода должна быть максимальной. Исходно $\Delta\bar{p}H$ представлена в виде $\Delta\Psi$, которая передается на другой конец митохондриального филамента и там утилизируется H^+ —АТР-синтазой. В результате возникает градиент рН внутри филамента: матрикс защелачивается в его ближнем к краю клетки конце и закисляется в дальнем. Изменения рН снаружи митохондрии должны быть невелики по сравнению с таковыми в матриксе из-за огромной



митохондрии погасли после лазерного облучения митохондрии 1 (стрелка); стрелки 1 и 2 на рис. е—и показывают соответственно облученный митохондриальный кластер и удаленный от него митохондриальный кластер, погасший вследствие облучения первого. Рис. и суммирует результаты электронно-микроскопического анализа, показавшего наличие митохондриальных филаментов между кластерами 1 и 2 (по: Амченкова и др. [4])



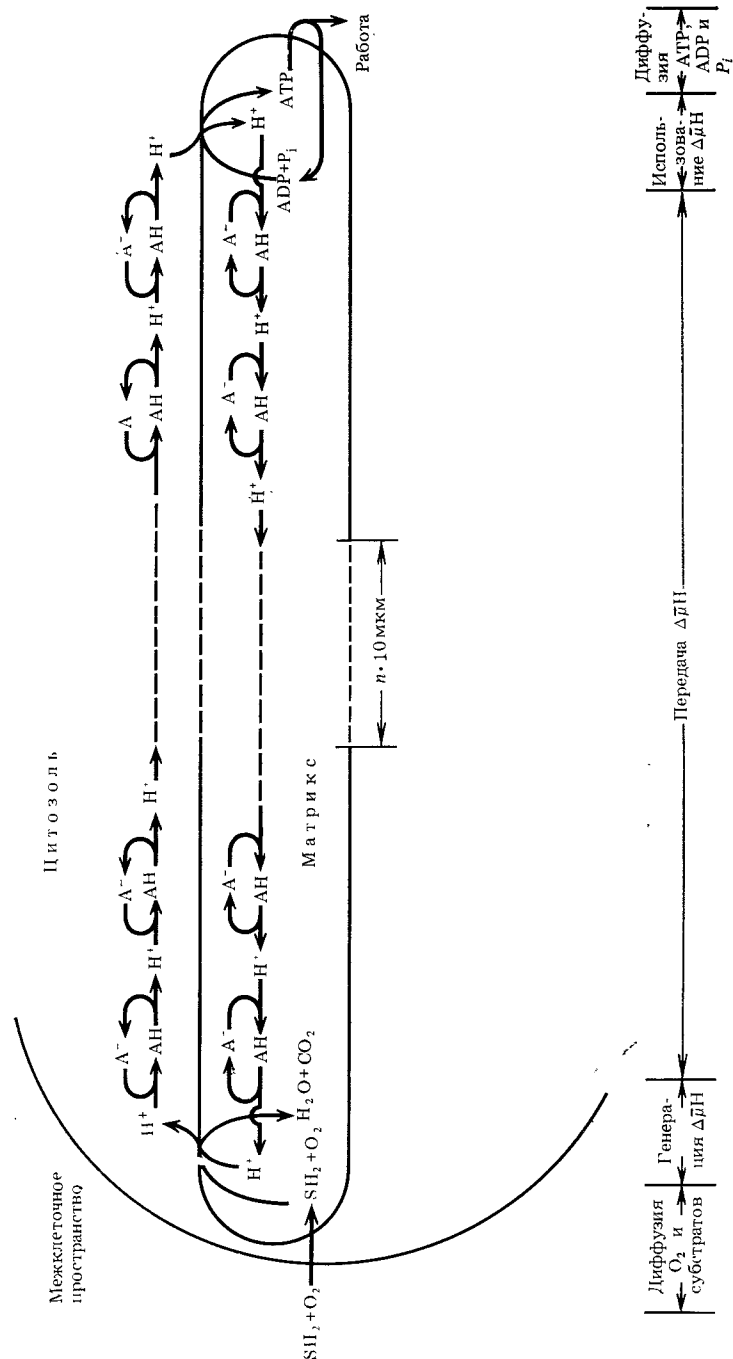


Рис. 111. Передача энергии вдоль нитчатой митохондрии от периферии клетки к ее центру
 SH_2 — субстрат дыхания, АН и А^- — протонированная и нейтротированная формы рН-буферов, участвующих в эстафетной передаче протонов вдоль митохондриального филамента

разницы в объемах цитозоля и матрикса. Образование градиента рН вызывает поток ионов H^+ , направленный внутри филамента к краю, а снаружи — к центру клетки. Как отмечалось в разделе 2.3, перенос ионов H^+ в водных фазах ускоряется рН-буферами, концентрация которых велика как внутри, так и снаружи митохондрий. Возможно также, что проводником протонов служит поверхность раздела мембрана-вода, как это было показано в модельной системе Пратсом и соавт. [1208]. В любом случае конечным результатом должен быть перенос энергии по митохондрии как по «протонному кабелю», что заменяет диффузию АТР, либо субстратов и кислорода от края клетки к ее центру, или диффузию АДФ и фосфата в противоположном направлении [1406]. Такого рода замена может, во-первых, ускорить внутриклеточный транспорт энергии и, во-вторых, превратить этот процесс из случайного в направленный, т. е. идущий в определенное место клетки.

В масштабах клетки перемещение вещества вдоль митохондриального филамента можно аппроксимировать диффузией в одномерном пространстве. Это значит, что, заменив диффузию АТР в цитозоле на диффузию H^+ и рН-буферов вдоль нитчатой митохондрии, мы как бы сокращаем два измерения из трех. Подобный эффект несомненно должен сэкономить время, необходимое для передачи энергии по определенному адресу, и предотвратить использование энергии прежде, чем она будет доставлена по этому адресу. Подобная логика позволяет понять, почему нитевидные митохондрии часто появляются в условиях тяжелой функциональной нагрузки или дефицита энергии (см. выше раздел 6.2.4.3).

Есть ряд свидетельств, что митохондриальные филаменты располагаются в клетке далеко не случайно. Так, они обычно ориентированы вдоль длинной оси клетки: «протонные кабели» тянутся от периферии к ядру (см. выше рис. 108, 109). Это направление совпадает с направлением пучков микротрубочек. Как уже отмечалось, существуют особые поперечные мостики между митохондриями и микротрубочками [1430]. Кроме того, Берайтер-Ханом [243] было сформулировано правило, согласно которому митохондрии локализуются там, где есть эндоплазматический ретикулум (о возможной связи этих структур см. раздел 6.2.4.8).

6.2.4.6. Гигантские митохондрии как пути транспорта Ca^{2+} жирных кислот и кислорода

Не только H^+ , но и другие ионы, метаболиты и т. д. могли бы, в принципе говоря, транспортироваться по нитчатым митохондриям. Например, любое вещество, концентрирующееся в матриксе, будет переноситься по митохондриальному филаменту как по трубопроводу. В частности, ионы Ca^{2+} , попавшие из межклеточного приграничного слоя цитозоля, будут аккумулироваться посред-

ством $\Delta\Psi$ -зависимого Ca^{2+} -унипортера в окончаниях митохондриальных филаментов и диффундировать по матриксу к противоположным концам этих филаментов, расположенным в центральных участках клетки. Если предположить, что в этих последних активирован $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -антипортер, то нитевидные митохондрии одним своим концом могли бы поглощать ионы Ca^{2+} на периферии клетки, а другим — выделять их в глубинных ее частях. (Относительно локальных градиентов ионов Ca^{2+} внутри клетки см.: [830].)

Подобную логику можно применить не только к Ca^{2+} , но и к любому другому компоненту, способному обратимо аккумулироваться в митохондриальном матриксе.

Другая вариация на ту же тему — это мембрана как транспортная артерия клетки, используемая для переноса жирорастворимых веществ. На первый взгляд транспорт веществ по мембранам должен происходить медленнее, чем по водной фазе клетки. Бытует мнение, что вязкость мембраны гораздо выше, чем вязкость цитоплазмы, а, следовательно, водный путь предпочтительнее для любого вещества, растворимого и в воде, и в липиде. Однако надо принять во внимание, что цитозоль и митохондриальный матрикс — это не водные растворы низкомолекулярных веществ, а скорее коллоидные растворы, к тому же пересеченные нерастворимыми структурами — мембранами и компонентами цитоскелета. Поэтому предположение о большей скорости диффузии в цитозоле по сравнению с таковой в мембране вряд ли может быть принято без доказательства, особенно если иметь в виду те мембраны, в которых преобладают липиды, а не белки. Последнее условие выполняется, например, для внешней мембраны митохондрий.

Сказанное позволяет понять результат прямого опыта, в котором измерялось движение низкомолекулярного спин-меченного соединения с коэффициентом распределения в системе липид/вода, близким к 1. Оказалось, что в клетках самых различных типов это соединение предпочтительно движется не по воде, а по липиду [829]. Такое предпочтение должно быть еще более выражено, если коэффициент распределения вещества — в пользу липида, как это имеет место, например, для жирных кислот и их эфиров с карнитином или CoA. В частности, мембранный путь был постулирован для ацил-CoA Сампером и Тройбле [1473]. Ацилкарнитин, по-видимому, приспособлен для выполнения этой функции даже лучше, чем ацил-CoA, так как по массе он значительно меньше.

Интересная проблема — транспорт молекулярного кислорода по мембранам. Можно указать по крайней мере четыре обстоятельства, благоприятные для транспорта O_2 по внутренней мембране митохондрий.

1. Растворимость O_2 в липиде примерно в 5 раз выше, чем

в воде. Это различие может быть еще больше, если сравнивать липид и цитозоль. Дело в том, что кислород не растворяется в связанной воде, образующей гидратные оболочки растворенных в ней веществ [1406].

2. Цитохромоксидаза — главный фермент, поглощающий кислород, локализована во внутренней мембране. Она имеет очень высокое сродство к кислороду (K_m цитохромоксидазы гораздо ниже концентрации O_2 в воде). Это может иметь следствием образование локальных областей низкой концентрации O_2 во внутренней митохондриальной мембране. Такие области действительно были обнаружены в районе скоплений митохондрий в гепатоцитах [786], где, как было отмечено выше, нет митохондриального ретикулула. В то же время в миокардиоцитах, где этот ретикулум есть, градиент концентрации O_2 между просветом капилляра и митохондриями работающего сердца обычно локализован, по-видимому, где-то снаружи клетки [1611]; только при гипоксических условиях удается наблюдать внутриклеточные градиенты O_2 [837].

3. Скорость диффузии O_2 в углеводородах в 10—100 раз выше, чем то следует из данных по макровязкости. Эта скорость оказывается одного порядка с таковой в воде [1468]. Измерение скоростей диффузии кислорода в плазме крови и в некоторых биологических мембранах при 37° дало близкие результаты [563]. Процесс диффузии кислорода в мембранах резко замедлялся холестеринем [563], которого, как известно, почти нет во внутренней мембране митохондрий.

4. В таких тканях, как мышечная, внутренняя митохондриальная мембрана составляет большую часть мембранного материала клетки. В этой ткани митохондрии заполняют почти все внутриклеточное пространство на периферии клетки непосредственно под ее внешней мембраной (рис. 112 и [1315, 13, 204]). Иными словами, пройдя сквозь внешнюю клеточную мембрану и попав в клетку, молекула кислорода тотчас встречает митохондрию, мембраны которой иногда непосредственно контактируют с мембраной клетки (см. выше рис. 106).

Однако даже в сердечной мышце, где митохондрий особенно много, митохондриальные мембраны по объему занимают малую часть клетки. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы решить, какой путь транспорта кислорода является главным: по мембранам или через цитозоль.

Если принять, что хотя бы частично реализуется мембранный вариант, то возникает интересная возможность кооперации трех процессов транспорта веществ вдоль мембран митохондриального ретикулула, например в мышечной ткани. При тяжелой физической работе резко возрастает утилизация жирных кислот в качестве субстратов дыхания. В результате могут возникать градиенты их концентрации с максимумом в районе жировых капель

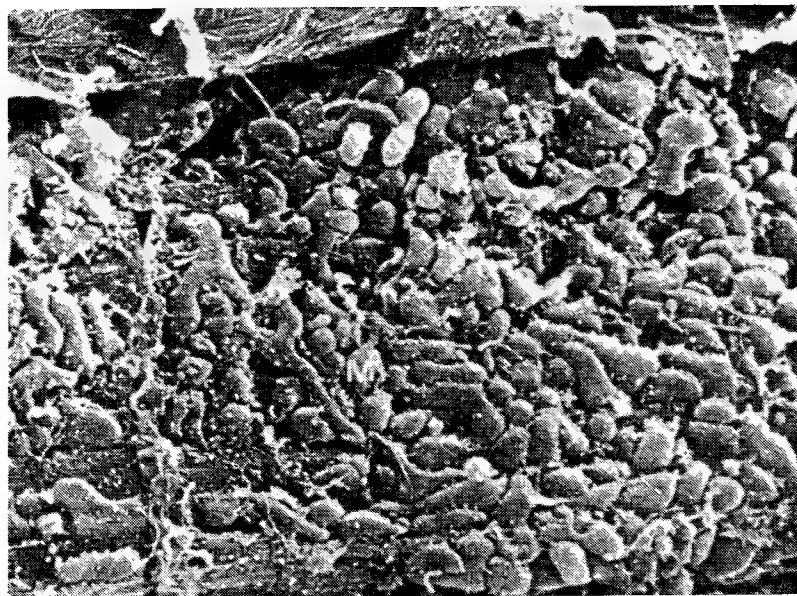


Рис. 112. Скопление митохондрий (М) под внешней мембраной миокардиоцита

Увеличение 3150 (по: Шимада и др. [1315])

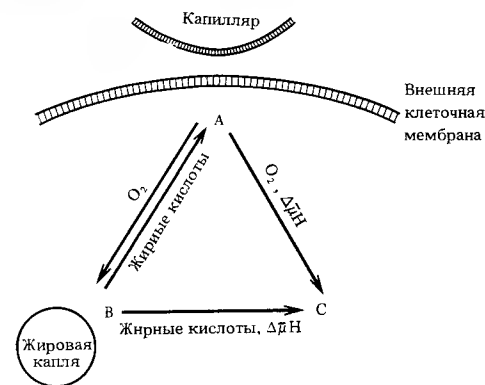


Рис. 113. Возможная кооперация транспорта ΔpH , кислорода и жирных кислот по мембранам митохондриального ретикулума

Предполагается, что кислород, диффундирующий из капилляра, появляется в цитоплазме на периферии клетки (точка А), встречает митохондриальную мембрану и диффундирует по ней в глубь клетки к точкам В и С. В точке В локализована жировая капля. Жирные кислоты, освобождающиеся из жировой капли, окисляются в точке В кислородом, поступающим из точки А, или переносятся по митохондриальным мембранам в точки А и С, чтобы там окислились; ΔpH , необходимая для синтеза АТФ, генерируется в точке С или переносится туда по внутренней митохондриальной мембране из точек А и В [1406]

(пункт В на рис. 113). Что касается O_2 , то его максимальный уровень должен быть вблизи капилляра (см. рис. 113, пункт А). Если скорость окислительного фосфорилирования лимитирована поставкой кислорода и жирных кислот, то максимальная кон-

центрация АДФ и фосфата должна наблюдаться при наибольшем удалении от пунктов А и В, т. е. в пункте С. Транспорт ΔpH , жирных кислот и кислорода по мембранам митохондриального ретикулума мог бы выравнивать все три градиента, тем самым облегчая функционирование мышечного волокна.

Изучая мышцу диафрагмы, мы обнаружили, что жировые капли внутри мышечной клетки всегда охватываются выростом митохондриального ретикулума [13]. На тесный контакт митохондрий и жировых капель в печени и поджелудочной железе указывают де Робертис и соавт. [445]. Они отмечают, что только одна (внутренняя) митохондриальная мембрана отделяет жировую каплю от матрикса, как если бы эта капля находилась в межмембранном пространстве митохондрии. Срочная мобилизация нейтрального жира в жировых каплях сопровождается таким массовым освобождением жирных кислот, что они, по всей вероятности, образуют континуум от жировой капли до внутренней мембраны митохондрий [261].

Почти ничего не известно о роли мембран в качестве возможных путей для жирорастворимых веществ — регуляторов метаболизма. Есть предположение о переносе стероидных гормонов по мембранам от края клетки к их внутриклеточным мишеням [1288, 1287]. Интересная возможность состоит в том, что диацилглицерид, образующийся из фосфатидилинозитдифосфата, вторичный посредник действия ряда гормонов и ростовых факторов (см. раздел 7.5), может достигать внутренних областей клетки, двигаясь по мембранам нитчатых или сетчатых митохондрий. Такое перемещение не требует освобождения диацилглицерина из внешней клеточной мембраны в цитозоль, если эта мембрана прямо контактирует с мембраной митохондрии.

6.2.4.7. Перенос составительных эквивалентов вдоль мембран

В эндоплазматическом ретикулуме и внешней митохондриальной мембране многих тканей (печень, почки, мозг, лейкоциты и т. д.) существует очень активная редокс-цепь, обрывающаяся, не достигая кислорода:



где fp_5 — флавопротеид NADH-цитохром b_5 -редуктаза [125]. Она практически отсутствует в быстрых мышцах взрослых организмов, но есть в медленных мышцах взрослых и обнаружена в быстрых мышцах 4-дневного крольчонка [1297]. Эта система участвует не менее чем в десяти различных процессах свободного окисления. Среди них: 1) Δ^5 -, Δ^6 - и Δ^9 -десатурация жирных кислот, 2) прямая десатурация фосфолипидов, 3) удлинение жирных кислот, 4) биосинтез плазмалогена, 5) дегидрогенизация 5- α -хо-

лест-7-ен-3- β -ола в холест-5,7-диен-3- β -ол, 6) деметилирование 4-метилстеролов, 7) восстановление N-гидроксиламинов, 8) восстановление цитохрома P-450, 9) восстановление цитохрома с и 10) восстановление метгемоглобина до гемоглобина (см. обзор: [1087]).

Большинство этих реакций вносит малый вклад в общую скорость окисления NADH в клетке. Путь через цитохром с может быть активирован в определенных условиях (см. раздел 5.4.2.3), но и тогда его скорость значительно уступает таковой NADH-оксидазы внутренней митохондриальной мембраны. Восстановление P-450 в большинстве случаев осуществляется NADPH-специфической редуктазой, так что путь через цитохром b_5 можно рассматривать лишь как подсобный механизм.

Несмотря на низкую общую скорость окисления цитохрома b_5 , его восстановитель (fp_5) чрезвычайно активен; fp_5 характеризуется числом оборотов, рекордным для редокс-ферментов. Поэтому неудивительно, что цитохром b_5 гепатоцита полностью восстановлен даже в аэробных условиях [1067].

В печени концентрация цитохрома b_5 очень высока: его больше, чем, например, любого редокс-фермента внутренней мембраны митохондрий [125]. Возникает вопрос, с какой целью используется клеткой такое большое количество цитохрома b_5 . Это нельзя объяснить низкой активностью данного цитохрома, так как добавленный цитохром с восстанавливается цитохромом b_5 с очень высокой скоростью. Низкая скорость переноса электронов на O_2 по пути, в котором участвует цитохром b_5 , обусловлена малой концентрацией свободного цитохрома с в межмембранном пространстве митохондрий. По нашему мнению, парадокс цитохрома b_5 еще ждет своего объяснения.

Давайте рассмотрим некоторые физические свойства fp_5 и цитохрома b_5 . Оба они состоят из двух неравных частей: большей гидрофильной, содержащей флавин или гем, и меньшей гидрофобной, требующейся для закоривания белка в мембране [1406]. Подобно челноку, fp_5 и цитохром b_5 могут перемещаться по поверхности мембраны, встречая сравнительно небольшое сопротивление. Высокая подвижность этих двух белков в плоскости мембраны была продемонстрирована Штригматтером и др. [1265, 1465, 1264]. В частности, было найдено, что мембрана эндоплазматического ретикулума может связывать большие количества добавленного цитохрома b_5 , так что соотношение $b_5 : fp_5$ достигает 100. Скорость восстановления цитохрома b_5 флавопротеидом, рассчитанная на моль b_5 , оказалась гораздо выше в мембранах, нагруженных цитохромом b_5 , чем в контрольных мембранах, содержащих обычное количество этого белка. Подобные соотношения были найдены также в мембранах, нагруженных fp_5 .

Другое обстоятельство, которое следует иметь в виду в данном контексте,— это содержание липидов в разных типах мембран.

Во внутренней мембране митохондрий, где fp_5 и цитохром b_5 отсутствуют, липидов сравнительно мало (25—30%), а в мембране эндоплазматического ретикулума и во внешней митохондриальной мембране, содержащей эти ферменты, липидов больше, чем белков [1406, 7]. Ясно, что ферменты-поплавки должны чувствовать себя «свободней» в мембранах, представляющих жидкий липидный бислой с редкими белковыми включениями.

Приняв во внимание все эти факты, мы выдвинули представление о том, что fp_5 и цитохром b_5 служат переносчиками восстановительных эквивалентов (соответственно атомов водорода и электронов) вдоль биологических мембран [180]. Поскольку редокс-потенциал fp_5 близок к таковому его восстановителя (NADH), этот флавопротеид, двигаясь вдоль мембран, может выравнивать градиенты редокс-потенциалов в области $-0,3V$ в различных частях клетки. Предполагается, что цитохром b_5 выполняет ту же функцию, но на уровне редокс-потенциалов около нуля.

6.2.4.8. Цитохром b_5 как межмембранный переносчик электронов

Еще одна функция цитохрома b_5 была обнаружена нами совместно с А. И. Арчаковым и А. В. Карякиным [8, 181]. Было найдено, что пузырьки эндоплазматического ретикулума или митохондрии печени способны восстанавливать цитохром b_5 протеолипосом, не содержащих других белков, кроме этого цитохрома. В качестве восстановителя использовали NADH. Поскольку эффект не снижался многократными промываниями эндоплазматического ретикулума, мы заключили, что fp_5 либо цитохром b_5 , либо оба эти фермента могут катализировать межмембранный перенос электронов без помощи каких-либо водорастворимых посредников.

Дальнейшие опыты показали, что данное свойство присуще только цитохрому b_5 . Пузырьки эндоплазматического ретикулума обрабатывали проназой при 4° , что приводило к разрушению цитохрома b_5 . При этом активность fp_5 сохранялась на вполне измеримом уровне. Такие пузырьки полностью утрачивали способность к межмембранному переносу электронов.

В другом опыте было показано, что 10-минутная предынкубация интактной системы перед добавкой NADH не ускоряет межмембранного переноса электронов. Поэтому миграция fp_5 между мембранами (см.: [1267, 539]) происходит слишком медленно, чтобы объяснить наблюдаемый эффект.

Используя фрагменты эндоплазматического ретикулума (микросомы) или митохондрии, обработанные мерсалилом (ингибитором fp_5), мы показали, что добавка небольших количеств интактных микросом или митохондрий делает возможным восстановление фонда цитохрома b_5 в ингибированных пузырьках при до-

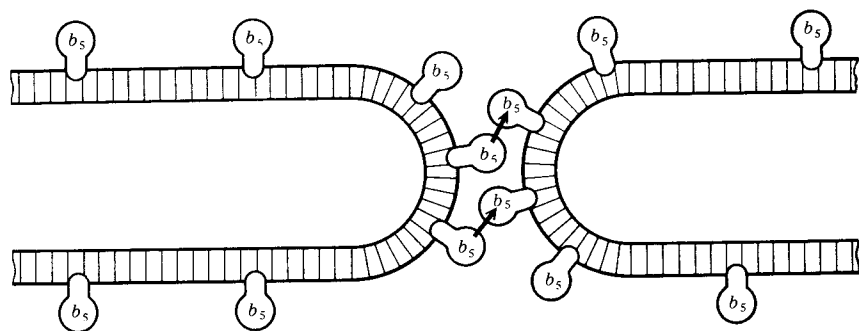


Рис. 114. Перенос электронов с конца одного мембранного тяжа на начало другого тяжа посредством цитохрома b_5

Стрелками показан межмембранный электронный транспорт

бавлении NADH. Таким образом, межмембранный перенос электронов возможен: 1) между двумя микросомальными пузырьками, 2) между двумя митохондриями и 3) между микросомой и митохондрией.

Интересное наблюдение было сделано Грингат и Роузманом [643], исследовавшими количество цитохрома b_5 в протеолипосомах, диаметр которых варьировал в 1,5 раза (от 21 до 35 нм). Выяснилось, что цитохром b_5 оказывается по крайней мере в 20 раз больше в пузырьках меньшего диаметра. Это означает, что цитохром b_5 может накапливаться в изогнутых участках мембраны, например, в концах митохондриальных филаментов.

Рис. 114 иллюстрирует возможный механизм переноса электронов через щель между двумя соседними митохондриальными филаментами. Предполагается, что молекулы цитохрома b_5 диффундируют в плоскости мембраны вдоль филаментов посредством броуновского движения, сканируя мембрану в поисках окислителя. В области, где два соседних мембранных тяжа находятся на расстоянии не более удвоенного диаметра гидрофильной головки цитохрома b_5 , цитохром более восстановленного филамента передает электрон цитохрому более окисленного филамента. Эта реакция облегчается вследствие концентрирования цитохромов b_5 в изогнутых окончаниях филаментов, что может быть частным случаем сформулированного нами более общего принципа о «таксисе» мембранных ферментов к их субстратам [1406]. Согласно развиваемым здесь представлениям, большая часть фонда цитохрома b_5 в данный момент времени не участвует в переносе электронов. Однако большое количество этого, казалось бы, «безработного» цитохрома совершенно необходимо, чтобы быстро найти место контакта двух мембранных структур и уравнивать

редокс-потенциал в тех областях клетки, где есть контактирующие мембраны митохондриального или эндоплазматического ретикулума. (Напомним, что митохондрии обычно локализируются в местах, где есть эндоплазматическая сеть.)

Межмембранный перенос электронов между митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом позволяет комбинировать диффузию в одномерном пространстве митохондриального филамента и двумерном пространстве цистерны эндоплазматической сети. Можно полагать, что таким путем редокс-потенциалы в разных участках клетки выравниваются быстрее, чем посредством диффузии метаболитов или кофакторов в трехмерном пространстве цитозоля.

Возникает вопрос, каким образом ткани, подобные быстрым мышцам, лишенные цитохрома b_5 , решают проблемы такого рода. В этой связи следует отметить, что площадь мембран эндоплазматического ретикулума в быстрых мышцах гораздо меньше, чем в ряде других тканей. Вместо этого здесь очень развит митохондриальный ретикулум. Может быть, межмембранный транспорт между митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом здесь оказывается ненужным. Что касается переноса электронов вдоль внешней мембраны митохондриального ретикулума, то он мог бы обеспечиваться ротенонустойчивой NADH-дегидрогеназой, присутствующей в этой мембране, так же как во многих других мембранах, за исключением внутренней митохондриальной [1406]. Для этого флавопротеида не обнаружено иных активных окислителей, кроме NAD^+ . Поэтому он представляется хорошим кандидатом на роль переносчика атомов водорода вдоль мембраны, подобного fp_5 .

Интересная возможность состоит в том, что клетка способна обратимо отключать определенные области цитоплазмы от рассматриваемой здесь объединенной редокс-системы, регулируя таким способом функциональную активность этих областей. Подобная регуляция могла бы реализоваться через изменения степени восстановления SH-групп определенных ферментов, а также кофакторов, например глутатиона.

В данной связи уместно отметить работы Крейна и др. [222, 409, 410, 625, 956], см. также [978]), свидетельствующие о том, что определенные гормоны контролируют ротенонустойчивую NADH-дегидрогеназу во внешней мембране животных и растительных клеток. Либберман [81] предположил, что fp_5 и цитохром b_5 играют ключевую роль в гипотетической системе внутриклеточного «молекулярного компьютера», трансформирующего различные внутри- и внеклеточные сигналы в функциональный ответ клетки.

В заключение этого раздела, посвященного движению белков-переносчиков электронов вдоль мембран, следует подчеркнуть более широкое значение процесса транспорта белков по мембранам. Показано, что целый ряд мембранных белков электрофоретически перемещается вдоль мембран под действием разности

электрических потенциалов между противоположными концами клетки [160, 198, 685, 994].

Интересной перспективой для будущих исследований может стать анализ такого рода явлений применительно к митохондриальным филаментам.

6.3. $\Delta\bar{p}H$ -буферы

6.3.1. Градиенты Na^+ и K^+ как $\Delta\bar{p}H$ -буфер у бактерий

Если протонный потенциал играет роль конвертируемой валюты, количество энергетических эквивалентов, накопленных в виде $\Delta\bar{p}H$, должно быть достаточно велико, чтобы стабилизировать, забуферивать колебания скоростей $\Delta\bar{p}H$ -образующих и $\Delta\bar{p}H$ -потребляющих процессов [127, 128, 1054, 1401].

Зная электрическую емкость и площадь мембраны, например бактериальной клетки, мы можем рассчитать, сколько ионов водорода будет откачено из цитоплазмы бактерии при образовании $\Delta\bar{p}H$ порядка 250 мВ (верхний предел $\Delta\bar{p}H$, поддерживаемой в энергизованных условиях). Приняв емкость равной $1 \text{ мкФ} \cdot \text{см}^{-2}$ [1156], получим количество H^+ , равное всего $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{г белка}^{-1}$, что соизмеримо с содержанием мембранных ферментов [1047]. Чтобы запасти энергию $\Delta\bar{p}H$ в «субстратных» количествах, необходимо разрядить мембрану потоком любых ионов, кроме H^+ . При этом снижение $\Delta\bar{\Psi}$ будет сопровождаться переносом новых порций ионов H^+ до тех пор, пока $\Delta\bar{p}H$ не возрастет до величины, эквивалентной 250 мВ.

pH-Буферная емкость цитоплазмы примерно на 2 порядка превышает электрическую емкость цитоплазматической мембраны, так что порция энергии, накопленной в $\Delta\bar{p}H$, оказывается гораздо большей, чем в $\Delta\bar{\Psi}$ [1403].

Дальнейшее увеличение количества «мембранной» энергии может быть достигнуто, если образованная таким способом $\Delta\bar{p}H$ затем используется, например, катион/ H^+ -антипортером, заменяющим $\Delta\bar{p}H$ на $\Delta\bar{p}K$ (катион). Включение такого антипортера, обменивающего, скажем, внутренний Na^+ на внешний H^+ , по существу, равносильно увеличению концентрации pH-буфера, как это впервые было отмечено Митчелом еще в 1968 г. [1047]. К сожалению, Митчел игнорировал роль другого одновалентного катиона — K^+ . По его мнению, накопление K^+ под действием $\Delta\bar{\Psi}$ есть нежелательный, хотя и неизбежный побочный эффект.

В 1978 г. мы выдвинули предположение [1402, 128], что вход K^+ используется бактериальной клеткой с целью превращения $\Delta\bar{\Psi}$ в $\Delta\bar{p}H$ и $\Delta\bar{p}K$. Образованная $\Delta\bar{p}K$, согласно нашей гипотезе, забуферивает $\Delta\bar{\Psi}$. Что касается $\Delta\bar{p}H$, то она утилизируется Na^+/H^+ -антипортером для образования $\Delta\bar{p}Na$. В результате $\Delta\bar{p}Na$ оказывается буфером $\Delta\bar{p}H$. Согласно этой концепции, бак-

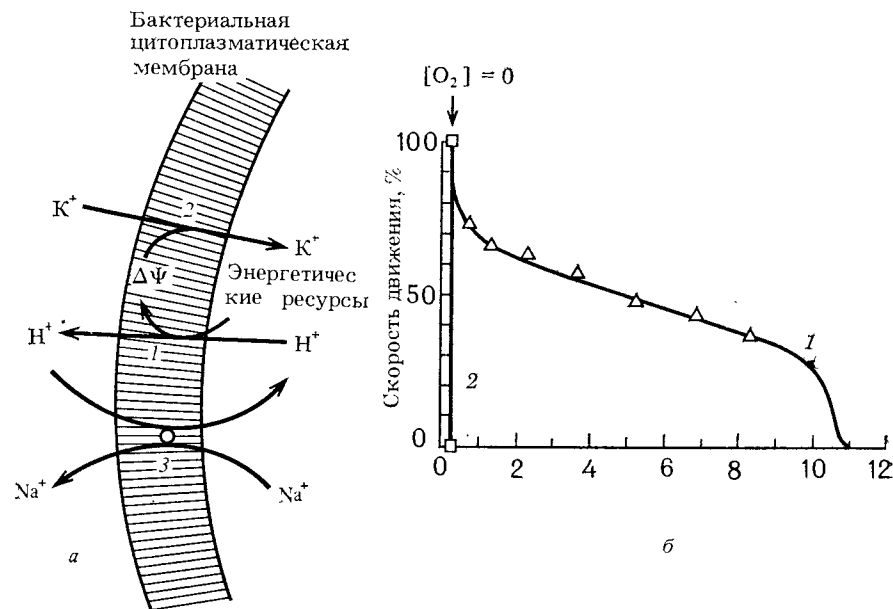


Рис. 115. Na^+/K^+ -градиент как $\Delta\bar{p}H$ буфер бактерий

а — $\Delta\bar{p}H$ -зависимое образование градиентов ионов Na^+ и K^+ на цитоплазматической мембране бактерий. H^+ , откачивается из клетки $\Delta\bar{p}H$ -генераторами (1). Образованная при этом $\Delta\bar{\Psi}$ вызывает электрофоретический вход ионов K^+ (2), который разряжает $\Delta\bar{\Psi}$, превращая ее в $\Delta\bar{p}H$. Na^+/H^+ -антипортер откачивает Na^+ из клетки за счет $\Delta\bar{p}H$ (3). Снижение $\Delta\bar{\Psi}$ и $\Delta\bar{p}H$ обращает ионные потоки, которые поддерживают некоторое время $\Delta\bar{\Psi}$ и $\Delta\bar{p}H$ в отсутствие внешних энергетических ресурсов [128]; б — движение клеток *Halobacterium halobium*, поддерживаемое Na^+/K^+ -градиентом. Результаты опытов (точки) [191] и компьютерного моделирования (кривые) [54]; 1 — K^+/Na^+ -буфер; 2 — без K^+/Na^+ -буфера

терия аккумулирует K^+ и выбрасывает Na^+ в условиях избытка энергетических ресурсов. Энергетический дефицит меняет направление ионных потоков: снижается $\Delta\bar{\Psi}$, и K^+ начинает выходить из клетки, двигаясь по градиенту своей концентрации; соответственно снижение $\Delta\bar{p}H$ приводит к входу Na^+ (рис. 115, а).

Гипотеза $\Delta\bar{p}H$ -буфера позволила объяснить ряд наблюдений, касающихся энергетики бактерий. В частности, было известно, что K^+ может электрофоретически накапливаться в бактериальных клетках (см. обзоры: [1403, 485, 684]). Среди таких механизмов прежде всего следует отметить систему транспорта калия (TrkA), описанную Эпштейном и соавт. в опытах на *E. coli* [1248]. Ее аллостерическим активатором служит АТФ, необходимый и для входа, и для выхода K^+ [210, 1452].

Na^+/H^+ -антипорт был описан в 1974 г. Уэстом и Митчелом [1584] у *E. coli*. Впоследствии его наличие было продемонстри-

рировано у многих видов бактерий (см. обзор: [886]). Недавно было найдено, что бактериальный Na^+/H^+ -антипорт, подобно аналогичному процессу во внешней мембране животной клетки, чувствителен к амилориду [1065]. К сожалению, до сих пор не выделен белок, ответственный за эту активность. Реконструкция протеолипосом, содержащих большое количество белков нефракционированного экстракта бактериальных клеток, остается пока что наибольшим достижением на пути к выделению Na^+/H^+ -антипортера [886, 1354, 1524].

Взаимодействие $\Delta\psi$ -зависимого импорта K^+ и ΔpH -зависимого экспорта Na^+ в принципе удовлетворяет требованиям, предъявляемым к ΔpH -буферу. Na^+ — наиболее массовый катион. Его концентрация в морской воде около 0,5 М. Поэтому клетка, откачивая Na^+ из цитоплазмы, может легко создать большой градиент ионов Na^+ . $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$ обычно гораздо ниже, чем $[\text{Na}^+]_{\text{наруж}}$, так что большая ΔpK может быть получена за счет аккумуляции K^+ внутри клетки. В то же время $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$ не столь мала, чтобы затруднить поиск этого катиона во внешней среде. Ведь K^+ — второй по массовости катион, если иметь в виду все ту же морскую воду.

Замена внутриклеточного Na^+ на K^+ и наоборот вряд ли должна слишком уж сильно сказаться на метаболизме и структуре клетки, поскольку свойства этих ионов во многом подобны, тем более что ни K^+ , ни Na^+ прямо не участвуют в биохимических реакциях.

Опыты, проведенные в нашей и ряде других лабораторий, подтвердили, что бактерии образуют Na^+/K^+ -градиенты при избытке энергии и используют их для совершения полезной работы при нехватке энергетических ресурсов. Наиболее существенны следующие наблюдения.

1. Преобразованные градиенты ионов Na^+ и K^+ могут поддерживать такую ΔpH -зависимую функцию, как движение галофильной *Halobacterium halobium*, морского *Vibrio harveyi*, а также *E. coli* после истощения энергетических ресурсов. У пресноводной *Phormidium uncinatum* был эффективен градиент K^+ , но не Na^+ [28, 29, 191, 310, 1403].

2. Градиенты Na^+ и K^+ стабилизируют уровень АТР в условиях энергетического дефицита [191, 1563]. Эта стабилизация обусловлена синтезом АТР, а не торможением его распада [191]. Одновременно стабилизируется мембранный потенциал [28, 29, 191, 310, 1028, 1403].

3. Поддерживаемый ионными градиентами синтез АТР прекращается раньше, чем движение [310].

4. Емкость Na^+/K^+ -буфера прямо пропорциональна концентрации соли в среде обитания бактерий, снижаясь в ряду *H. halobium* > *V. harveyi* > *E. coli* > *Ph. uncinatum*. У *H. halobium*, предынкубированной на свету, градиенты Na^+ и K^+ все еще под-

держивают движение спустя более чем 8 ч после прекращения освещения и истощения O_2 (см. рис. 115, а). Это означает, что галобактерия в течение дня способна вложить в Na^+/K^+ -градиент столь значительную порцию энергии, что ее практически хватает на всю ночь [191, 310].

5. Динамика функций, поддерживаемых Na^+/K^+ -градиентами, складывается из трех фаз: быстрого частичного торможения, стабилизации на промежуточном уровне и быстрого снижения до нуля [191, 310] (см., например, рис. 115, б).

Количественные соотношения (пункты 3–5) оказались в хорошем соответствии с математической моделью, рассчитанной В. С. Маркиным и А. Л. Драчевым для стабилизации ΔpH градиентами Na^+ и K^+ [54, 485].

Как показали дальнейшие опыты, клетка расходует Na^+/K^+ -градиент с большой осторожностью, чтобы предотвратить «энергетическое банкротство» при истощении своего последнего резерва. Добавление валиномицина к голодающим клеткам приводит к немедленному выходу всего накопленного K^+ , что сопровождается быстрым подъемом уровня АТР, который, однако, оказывается неустойчивым и резко снижается до величин, меньших, чем до внесения в пробу валиномицина [29, 191].

Как показали работы группы Кепеша [838, 1021], выход ионов K^+ из клеток *E. coli* регулируется интермедиатами цикла Кребса, глюкозой, а также неметаболизируемыми фосфорилированными производными глюкозы. Был получен ряд мутантов, лишенных этой регуляции. У мутантов система выхода ионов K^+ была постоянно активирована. Одну из мутаций удалось локализовать в опероне глутатионсинтазы: У исходного штамма регуляцию можно было отключить N-этилмалеимидом. Это нарушение снималось глутатионом и γ -глутамиламинобутирилглицином (офтальмовой кислотой) — аналогом глутатиона, не содержащим SH-группы. Поскольку все перечисленные эффекты никак не влияли на активность ТгК-системы, авторы заключили, что выход K^+ происходит через особые каналы, ингибируемые глутатионом (см. также раздел 5.2.2).

Взаимодействие K^+ -унипорта и Na^+/H^+ -антипорта — это простейший, но не единственно возможный механизм стабилизации ΔpH градиентами одновалентных катионов. У некоторых бактерий, по крайней мере в щелочной среде, имеет место электрогенный Na^+/H^+ -антипорт [886]. Кроме того, накопление K^+ может катализироваться K^+ , H^+ -симпортером [209]. В подобных случаях ΔpNa стабилизирует не только ΔpH , но и (в меньшей степени) $\Delta\psi$. Соответственно ΔpK стабилизирует и $\Delta\psi$, и ΔpH , причем эффект более выражен в отношении $\Delta\psi$ [485].

С одной стороны, вероятно, стабилизация ΔpH необходима прежде всего в мембранах, располагающих сразу многими путями образования и использования ΔpH . Такова, например, цитоплаз-

матическая мембрана дышащих или фотосинтезирующих бактерий, где имеются дыхательные (фотосинтетические) $\Delta\bar{p}H$ -генераторы, H^+ —АТР-синтаза, $\Delta\bar{p}H$ -зависимые переносчики и H^+ -моторы.

С другой стороны, проблема стабилизации $\Delta\bar{p}H$ может и не стоять у анаэробных неподвижных бактерий, живущих гликолизом. В их цитоплазматической мембране есть только один тип $\Delta\bar{p}H$ -генераторов (H^+ —АТРаза, использующая гликолитический АТР) и один тип потребителей $\Delta\bar{p}H$ (H^+ , метаболит-симпортеры). Как раз в этой группе микроорганизмов можно найти представителей, у которых содержание Na^+ внутри клетки оказывается выше, чем снаружи (см., например, [1442]). Та же логика справедлива применительно к внутриклеточным пузырькам и органеллам, специализированным на $\Delta\bar{p}H$ -зависимом синтезе АТР (хроматофоры бактерий-фотосинтетиков, митохондрии и хлоропласты). Они используют упрощенные варианты механизма стабилизации $\Delta\bar{p}H$.

6.3.2. Другие системы стабилизации $\Delta\bar{p}H$

Обычно биологическая мембрана делит некий объем на две неравные части. Поэтому активный транспорт ионов H^+ через мембрану изменяет рН в основном (или даже исключительно) в меньшем отсеке. Если в этом отсеке нет ферментов, то механизм стабилизации $\Delta\bar{p}H$ может быть упрощен таким образом, что его натриевый компонент попросту отсутствует. Наиболее демонстративный пример — тилакоиды хлоропластов. Здесь ионы H^+ , транспортируемые через мембрану, освобождаются во внутритилакоидное пространство, которое представляет собой очень узкую щель, поперечник которой того же порядка, что и толщина мембраны. В этой щели практически нет ферментов. Поэтому нет риска, что закисление внутритилакоидного пространства инактивирует какой-либо ферментативный процесс. Как уже отмечалось выше (раздел 3.3.5), стабилизация $\Delta\bar{p}H$ происходит за счет перехода $\Delta\bar{\Psi} \rightarrow \Delta\bar{p}H$, сопровождающего перенос K^+ , Mg^{2+} и Cl^- через мембрану тилакоидов. Поскольку внутритилакоидное пространство очень мало по сравнению с объемом стромы хлоропласта, $\Delta\bar{p}H$ образуется почти исключительно за счет закисления среды внутри тилакоида, рН которой может быть на 3 единицы ниже, чем в строме.

Некоторая стабилизация $\Delta\bar{p}H$ необходима хлоропласту из-за колебаний интенсивности света, всегда происходящих в естественных условиях. Вероятно, по этой причине хлоропласт превращает $\Delta\bar{\Psi}$ в $\Delta\bar{p}H$.

Та же проблема существует и в бактериальных хроматофорах. У *Rhodospirillum rubrum* она может быть решена посредством H^+ — PP_i -синтазы. Этот весьма активный фермент использует

$\Delta\bar{p}H$, чтобы образовать PP_i из $2P_i$. Путей утилизации PP_i , соизмеримых по скорости с H^+ — PP_i -синтазой, для этой бактерии описано не было. Мы предположили, что главный путь превращения PP_i у *Rh. rubrum* — это гидролиз PP_i с образованием $\Delta\bar{p}H$ при обращении H^+ — PP_i -синтазной реакции [1403]. Синтез АТР есть основная функция хроматофоров. Существенно, что PP_i стабилизирует $\Delta\bar{p}H$ на уровне, достаточном для синтеза АТР, поскольку энергии гидролиза PP_i и АТР близки.

Внешняя мембрана клеток высших растений, вероятно, стабилизирует $\Delta\bar{p}H$ тем же путем, что тилакоиды. Протоны, откачиваемые из клетки H^+ —АТР-синтазой, оказываются в узком межклетнике, где рН может быть на две единицы ниже, чем в цитоплазме.

У пресноводных цианобактерий $\Delta\bar{p}Na$ правильного направления не может быть образована из-за низкой $[Na^+]_{\text{наруж}}$. Здесь емкость $\Delta\bar{p}H$ -буфера невелика, поскольку используется только одна его составляющая — $\Delta\bar{p}K$ [310].

Для митохондрий проблема $\Delta\bar{p}H$ -буфера стоит не так остро, как для бактерий и хлоропластов, поскольку уровень дыхательных субстратов колеблется, как правило, в меньшей степени, чем уровень света. Неудивительно поэтому, что $\Delta\bar{p}H$ в митохондриях представлена главным образом в виде $\Delta\bar{\Psi}$. Среди возможных претендентов на роль $\Delta\bar{p}H$ -буфера здесь можно назвать унипорт K^+ , а в тканях с сильно меняющейся активностью типа мышечной — объединение митохондрий в митохондриальный ретикулум.

6.3.3. Карнозин и ансерин как специализированные рН-буферы

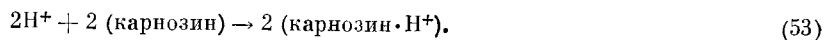
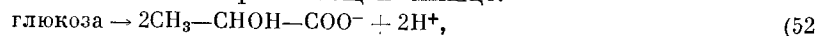
В мышцах есть по крайней мере одна специфическая система, существенная для стабилизации $\Delta\bar{p}H$ и для гомеостаза в целом. Мы имеем в виду гистидинсодержащие дипептиды карнозин и ансерин (соответственно β -аланилгистидин и β -аланил- N' -метилгистидин). Первое из этих веществ было открыто еще в 1900 г. русскими биохимиками В. С. Гулевичем и С. Амираджиби [661]. Однако функция дипептидов и поныне считается неясной.

Почти все количество карнозина и ансерина, имеющееся в организме, находится в мышцах, где их концентрация может достигать 0,1 М. В подавляющем большинстве других тканей эти дипептиды отсутствуют. Исключение составляют лишь клетки слизистого эпителия желудка и хеморецепторные нейроны обонятельного эпителия.

В мышцах наиболее яркий эффект дипептидов был описан С. Е. Севериным и соавт. в 1953 г. [116]. Было обнаружено, что добавление карнозина к раствору Рингера, используемому для перфузии изолированной мышцы, резко удлиняет время, в течение которого мышца может работать без утомления. Как показали

измерения АТР, АДФ, АМР, P_i , креатинфосфата и лактата, сильно изменяется под влиянием карнозина только последний параметр: мышца приобретает способность накапливать лактат вплоть до очень больших концентраций (порядка 0,1 М) без каких-либо неблагоприятных последствий. Специальное исследование, предпринятое впоследствии для анализа механизма этого удивительного явления, не обнаружило какого-либо действия карнозина на активность гликолитических ферментов *in vitro* [1219].

Ключ к объяснению эффекта мышечных дипептидов следует искать, по-видимому, в рН-буферных свойствах этих соединений. Одно из рК карнозина равно 6,9, а ансерина — 7,1 [462], что гораздо выше рК лактата (3,85). Поэтому карнозин и ансерин могут связывать ионы H^+ , освобождающиеся при аккумуляции анионов лактата в работающей мышце:



Таким образом, протонирование карнозина оказывается как бы конечным этапом гликолиза в мышечной ткани.

Как было впервые отмечено Бэйт Смитом [232] и впоследствии подтверждено Дейви [433], карнозин и ансерин обуславливают примерно 40% буферной емкости в быстрых скелетных мышцах. Остальное приходится в основном на протонакцепторные группы белков. Есть огромное функциональное различие между белками и дипептидами как акцепторами протонов. Протонирование белков обычно отражается на их каталитических и других биологически важных свойствах. Протонирование дипептидов может происходить без каких-либо побочных метаболических эффектов, если принять вслед за Бэйт Смитом и Дейви, что карнозин и ансерин суть соединения, специализированные на роли рН буферов.

Еще одно, быть может, также очень важное преимущество дипептидов состоит в том, что они подвижны в водной фазе клетки, в то время как наиболее массовые мышечные белки (актомиозиновый комплекс, белки Z-дисков, белки мембран и цитоскелета) в сильной степени иммобилизованы. Как было найдено в нашей группе А. Д. Кауленом (см. выше раздел 2.3), мобильные рН-буферы резко ускоряют выравнивание концентрации водородных ионов по всему объему водной фазы, тем самым предотвращая появление локальных сдвигов рН. (Этот эффект был недавно подтвержден и детально исследован Гутманом и др. [664, 665].) Подобная функция дипептидов может иметь принципиальное значение, предотвращая кислотную денатурацию белков в локальных очагах анаэробного дыхания, возникающих в работающем мышечном волокне.

Согласно расчету, проведенному недавно Юнге и Мак-Лафлином [791], такие макромолекулярные и иммобилизованные рН-

буферы, как белки, могут снижать эффективную скорость диффузии протонов на несколько порядков. Этого не происходит, если присутствуют подвижные рН-буферы, причем значительное ускорение достигается, даже если вклад подвижных буферов в общую буферную емкость составляет всего 1%.

Будучи подвижными, дипептиды не столь малы по размеру, чтобы легко проходить сквозь мембраны, как это делает свободный имидазол (рК 7,0) — функциональная группа карнозина, ответственная за его рН-буферные свойства при физиологических рН. Во внешней клеточной мембране есть специальный переносчик карнозина, осуществляющий аккумуляцию дипептида в клетке [783]. Такой эффект был бы невозможен, если бы рН-буфером был проникающий через мембрану имидазол.

В рамках изложенных выше взглядов мы можем объяснить и другие наблюдения, касающиеся дипептидов. Они локализованы в тканях, где риск закисления цитоплазмы особенно велик: в быстрых мышцах, переключающихся на гликолиз при нехватке кислорода, которая обычно сопутствует тяжелой работе, а также в клетках слизистой желудка, омываемых очень кислой средой. Замечена хорошая корреляция гликолитической активности и содержания дипептидов в различных мышцах [42, 353, 427, 433, 731, 1356]. Концентрация карнозина в мышечной ткани резко возрастает после рождения, когда мышцы начинают активно функционировать [1356].

Описанное С. Е. Севериным действие карнозина на работу изолированной мышцы было недавно воспроизведено при добавлении трис-буфера вместо дипептида. Эффект этого буфера был очень резко выражен в анаэробных условиях [520].

Роль рН-буфера предопределяет большую концентрацию дипептидов в мышечной ткани. При этом дипептиды достаточно индифферентны для реакций метаболизма. Сказанное не означает, однако, что дипептиды монофункциональны. Так, карнозин может использоваться организмом как резерв гистидина. Кроме того, дипептиды вносят свой вклад в создание антиоксидантной системы мышечной ткани [97, 115]. Однако эта их функция не в состоянии объяснить очень высокую концентрацию дипептидов в некоторых типах мышц.

Совершенно особая ситуация обнаружилась в обонятельных нейронах. Здесь карнозин оказался нейротрансмиттером [984, 985]. Данный случай — еще одна иллюстрация общего принципа полифункциональности биологических соединений, который был отмечен в начале нашей книги, когда речь шла о нейротрансмиттерной роли АТР.

Возвращаясь к мышцам, отметим, что рН-буферные свойства карнозина и ансерина могут использоваться мышечной клеткой не только для пролонгирования гликолиза, но также и во всех других случаях, когда необходимо стабилизировать рН. Среди

них следует упомянуть в данном контексте образование ΔpH на митохондриальной мембране.

Дипептиды повышают рН-буферную емкость растворов, омывающих мембраны митохондрий. Соответственно увеличивается количество ионов H^+ , которое надо перенести через эти мембраны, чтобы создать ΔpH , достаточную для перехода в состояние дыхательного контроля. Тем самым возрастает количество энергетических эквивалентов, накопленных в форме ΔpH . Последнее может оказаться существенным для быстрых мышц, при работе которых наблюдаются резкие изменения уровня O_2 . Кроме того, дипептиды могут участвовать в транспорте H^+ вдоль мембран митохондриального ретикулума (см. раздел 6.2.4.5).

Глава 7

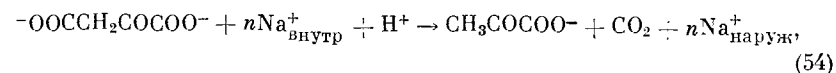
Натриевый мир

Прогресс биоэнергетических исследований последних лет стимулировал интерес к ионам Na^+ . Оказалась поколебленной догма о H^+ как единственном сопрягающем ионе. Выяснилось, что роль Na^+ не ограничивается его функцией в системе ΔpH -буферов. У некоторых форм жизни ион Na^+ прямо вовлечен в превращения энергии, заменяя ион H^+ . Значительное таксономическое разнообразие видов, использующих Na^+ , а не H^+ в качестве первичного сопрягающего иона, указывает на всеобщее распространение вновь открытого типа мембранной энергетики. Возникает впечатление, что наряду с миром живых существ, чья энергетика базируется на циркуляции протонов, существует достаточно обширная область, которую можно было бы назвать «натриевым миром». В настоящей главе мы рассмотрим наблюдения, касающиеся этого нового аспекта нашей науки.

7.1. Генераторы ΔpNa

7.1.1. Декарбоксилазы, транспортирующие Na^+

В 1980 г. Димрот [467] сообщил об открытии первичного ΔpNa -генератора, откачивающего Na^+ из цитоплазмы бактериальной клетки без участия ΔpH . Было показано, что *Klebsiella aerogenes*, растущая в анаэробных условиях, во-первых, декарбоксилирует оксалоацетат в пируват и CO_2 только в присутствии Na^+ и, во-вторых, декарбоксилирование сопряжено с переносом Na^+ из клетки во внешнюю среду против концентрационного градиента:



где n , скорее всего, равно 2.

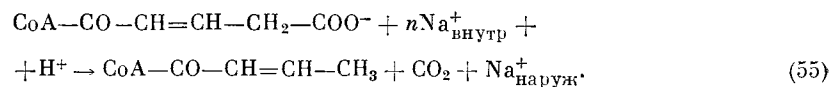
Указанный процесс мог быть показан как в интактных клетках, так и в вывернутых субклеточных пузырьках [468]. Реакция, катализируемая биотинным ферментом, локализованным в цитоплазматической мембране, протекала в два этапа: 1) перенос карбоксила с оксалоацетата на биотинную простетическую группу и 2) освобождение CO_2 из карбоксилированного биотина с регенерацией исходной формы фермента. Для второго этапа требовался Na^+ [470]. Декарбоксилирование и транспорт

Na^+ были чувствительны к авидину, ингибитору биотиновых ферментов. При транспорте Na^+ внутренний объем вывернутых субклеточных пузырьков заряжался положительно, что свидетельствовало об электрогенном характере этого транспорта; $\Delta\psi$ и $\Delta p\text{Na}$, измеренные соответственно по накоплению радиоактивных SCN^- и Na^+ , были равны 65 и 50 мВ, т. е. общая $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ оказалась 115 мВ [469].

Оксалоацетатдекарбоксилаза *K. aerogenes* состоит из α -, β - и γ -субъединиц с молекулярными массами соответственно 65, 34 и 12 кДа. α -Субъединица — периферический белок, в то время как β - и γ -субъединицы — интегральные мембранные белки, переходящие в раствор только в присутствии детергента. Биотин связан с α -субъединицей. Ее триптическое переваривание дает 51 кДа-полипептид, не содержащий биотина. Протеолиз β -субъединицы тормозится ионами Na^+ . Эти факты могут указывать на то, что α -субъединица участвует в катализе, а β -субъединица имеет отношение к транспорту Na^+ [474].

Дальнейшие исследования показали, что *K. aerogenes* — единственный микроорганизм, располагающий Na^+ -транспортирующей декарбоксилазой. Na^+ -транспортирующая оксалоацетатдекарбоксилаза обнаружена также у *Klebsiella pneumoniae* [475] и *Salmonella typhimurium* [471].

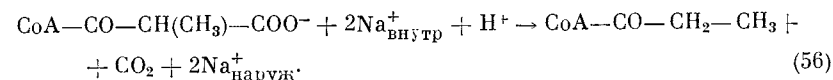
У *Acidaminococcus fermentans*, *Peptococcus aerogenes*, *Clostridium symbiosum* и *Fusibacterium nucleatum* глутаконил-CoA (интермедиат сбраживания глутамата до ацетата и бутирата) декарбоксилируется в кротонил-CoA сопряженно с транспортом Na^+ :



Эта система была открыта Букелем и соавт. [326—328, 1612]. Ферменты из четырех названных выше видов бактерий отличаются по молекулярным массам, но имеют ряд общих существенных свойств. Все они содержат биотин, чувствительны к авидину, требуют Na^+ и могут быть реконструированы в протеолипосомы, накапливающие Na^+ при декарбоксилировании. Монасин предотвращает образование градиента Na^+ .

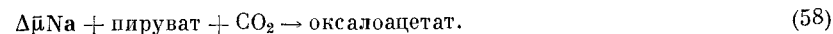
Независимо группа Димрота показала, что декарбоксилирование метилмалонил-CoA в пропионил-CoA также поддерживает транспорт Na^+ . Эта реакция обнаруживается у строго анаэробной *Veilonella alcalensis*, превращающей лактат в ацетат и пропионат [721, 722], и у *Propionigenum modestum*, утилизирующей сукцинат с образованием пропионата [472, 723]. Перед декарбоксилированием сукцинат превращается в метилмалонил-CoA, декарбоксилирование которого собственно и сопряжено с транс-

портом Na^+ :



Фермент, как и в предыдущих случаях, содержит биотин и требует Na^+ для декарбоксилирования. Субклеточные пузырьки *V. alcalensis* переносят два иона Na^+ на каждую молекулу декарбоксилированного субстрата [722]. Декарбоксилаза была очищена и встроена в протеолипосомы. Декарбоксилирование создавало тридцатикратный градиент Na^+ между внутренностью протеолипосом и средой. Протонофоры ускоряли вход ионов Na^+ в протеолипосомы, по-видимому, сбрасывая $\Delta\psi$, которая образовывалась при унипорте Na^+ [722, 1266].

Встроив в одну и ту же протеолипосому декарбоксилазу метилмалонил-CoA из *V. alcalensis* и оксалоацетатдекарбоксилазу из *K. aerogenes*, Димрот и Хильперт [473] показали, что декарбоксилирование метилмалонил-CoA обращает реакцию декарбоксилирования оксалоацетата. Это означает, что химическая работа может в принципе совершаться за счет $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, образуемой Na^+ -транспортирующей декарбоксилазой:



7.1.2. Na^+ -транспортирующая дыхательная цепь

В 1977 г. Унемoto и соавт. описали активацию ионами Na^+ NADH-оксидазы морской щелочустойчивой *Vibrio alginolyticus* и умеренно галофильной *Vibrio costicola*. Другие катионы были неэффективны. В тех же условиях NADH-оксидаза *E. coli* не требовала Na^+ для достижения максимальной активности [1538]. Дальнейшие исследования той же группы выявили, что Na^+ -зависимая стадия локализована между NADH-дегидрогеназой и менахиноном или убихиноном, в то время как цитохромный сегмент цепи активен и без Na^+ [1536].

В 1981—1982 гг. Токуда и Унемoto [1511, 1512] продемонстрировали сопряженный с дыханием экспорт Na^+ из клеток *V. alginolyticus*. Затем авторам удалось выделить Na^+ -транспортирующую NADH-мена(уби)хионредуктазу и встроить ее в протеолипосомы. Окисление NADH протеолипосомами сопровождалось накоплением в них ионов Na^+ . Исключение Na^+ из состава среды инкубации тормозило скорость окисления NADH [1507] в 15 раз. В нативных бактериальных мембранах зависимость дыхания от Na^+ была выражена слабее [1511, 1515].

Na^+ -транспортирующая NADH-хионредуктаза имеет оптимум pH между 8,5 и 9,0. Она специфически тормозится ионами Ag^{2+} , а также очень низкими концентрациями N-окиси 2-гептил-

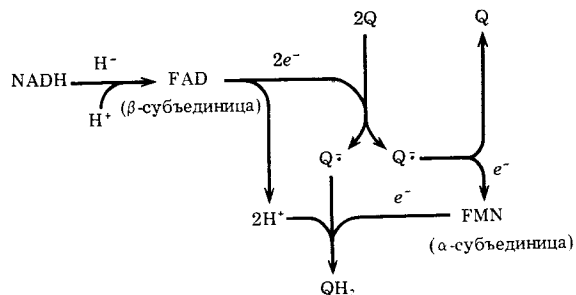


Рис. 116. Гипотетический механизм Na^+ -транспортирующей NADH-хинон-редуктазы *V. alginolyticus*

Стадия, катализируемая α -субъединицей, специфически требует ионов Na^+ , поэтому предполагается, что она сопряжена с транспортом Na^+ (по: Унемото и Хайяши [1537])

4-оксихинолина (HQNO). Окисленный (но не восстановленный) ТМФД снимает тормозящее действие HQNO [1512, 1417, 465, 194, 1510]. Na^+ -независимая NADH-хинонредуктаза, сосуществующая с Na^+ -зависимой, оказалась устойчивой к тем же концентрациям HQNO. В то же время детергент липонокс тормозил Na^+ -независимый фермент и не влиял на Na^+ -зависимый [1514].

По данным Унемото и Хайяши [697, 1537], Na^+ -транспортирующая NADH-хинонредуктаза состоит из двух мономеров, составленных из трех субъединиц: α (52 кДа), β (46 кДа) и γ (32 кДа). Соответствующие гены находятся, по-видимому, в большей из двух плазмид, обнаруженных у *V. alginolyticus*. α -Субъединица содержит FMN, а β -субъединица — FAD. В отсутствие CoQ NADH восстанавливает FAD, но не FMN. Очищенная α -субъединица сама по себе не обладает какой-либо ферментативной активностью, но при реконструкции с очищенными β - и γ -субъединицами она дает комплекс, восстанавливающий CoQ до CoQH₂ посредством NADH. Максимальная активность наблюдается при соотношении FAD : FMN около 1. Без γ -субъединицы комплекс неактивен. Авторы предположили (рис. 116), что β -субъединица катализирует перенос восстановительных эквивалентов с NADH на FAD и далее на CoQ с образованием CoQ^{•-} (NADH-дегидрогеназная часть комплекса), а α - и β -субъединицы ответственны за дисмутацию двух CoQ^{•-} с образованием CoQH₂ и CoQ. Именно эта последняя реакция зависит от Na^+ .

По данным Токуды и Унемото [1512], транспорт Na^+ NADH-хинонредуктазой носит электрогенный характер, что было установлено в опытах на целых клетках, поглощавших катионы тетрафенилфосфония или (в присутствии протонофора) ионы H^+ в условиях, когда дыхание откачивало из цитоплазмы ионы Na^+ . В согласии с этими данными И. А. Смирнова в нашей группе [465, 1417] показала, что Na^+ необходим для генерации $\Delta\psi$

в вывернутых субклеточных пузырьках *V. alginolyticus*, окисляющих добавленный NADH ($\Delta\psi$ измеряли по поглощению аниона фенилдикарбоундекаборана). Образование $\Delta\psi$ полностью блокировалось посредством HQNO или грамицидина А. ХКФ и моносин, добавленные порознь, не смогли предотвратить образование $\Delta\psi$, в то время как вместе они сильно снижали $\Delta\psi$. Окисление NADH без Na^+ происходило с меньшей скоростью и без образования $\Delta\psi$.

Как в интактных клетках, так и в протеолипосомах перенос Na^+ , сопряженный с дыханием, происходил против $\Delta\bar{\mu}Na$ [1507, 1512].

Было показано, что рост *V. alginolyticus* при щелочных pH гораздо более устойчив к действию протонофора ХКФ, чем рост *E. coli*. При pH 8,5 вибрионы поддерживали градиенты Na^+ , K^+ и H^+ , несмотря на присутствие ХКФ [1513]. Был выделен штамм *V. alginolyticus*, не имеющий Na^+ -транспортирующей NADH-хинонредуктазы. Он оказался чувствительным к ХКФ [1514].

Унемото и др. [1513, 1538] показали, что Na^+ необходим для максимальной активности NADH-оксидазы *Vibrio costicola*. В то же время Хаманде и др. [671—673], изучая энергетику этого вибриона, пришли к выводу, что она базируется на откачке дыханием ионов H^+ , а не Na^+ . Авторы относят *V. costicola* к нейтрофилам, так как они растут в пределах pH 5,5—9,0 [671], в то время как *V. alginolyticus* принадлежит к щелочеустойчивым микроорганизмам [1512]. Вопрос о том, H^+ или Na^+ играют роль сопрягающего иона *V. costicola*, требует дальнейших исследований. Вполне возможно, что Na^+ - и H^+ -транспортирующие дыхательные цепи сосуществуют в мембране этих вибрионов, преобладая при росте соответственно в щелочной или нейтральной среде.

Свидетельство в пользу такой возможности было недавно получено в лаборатории Унемото. Оказалось, что вывернутые субклеточные пузырьки *V. costicola* окисляют NADH с образованием $\Delta\bar{\mu}Na$. В тех же условиях окисление лактата давало $\Delta\bar{\mu}H$. В последнем (но не в первом) случае перенос Na^+ был сопряжен с дыханием лишь косвенно, при участии Na^+/H^+ -антипортера, чувствительного к амилориду [1533]. По данным нашей группы, окисление NADH субклеточными пузырьками *V. alginolyticus* образует Na^+ -потенциал, а окисление сукцината — H^+ -потенциал.

Недавно были получены сведения о существовании « Na^+ -дыхания» у *Vibrio parahaemolyticus* [1525].

Другой пример Na^+ -транспортирующего дыхания был описан не так давно Ави-Дором и соавт. [831—834, 1371]. Работая с галотолерантной бактерией Ba₁, авторы показали, что добавка Na^+ при pH 8,5 стимулирует поглощение кислорода, генерацию $\Delta\psi$ и вход протонов в клетку. Разобщитель-протонофор вызывал дальнейшее увеличение входа H^+ , сопровождающееся снижением

ΔΨ. Эти наблюдения можно было объяснить, предположив, что дыхательная цепь откачивает Na^+ из цитоплазмы, тем самым генерируя ΔΨ. Существенно, что данная система действовала только в щелочных условиях, будучи неактивной при pH 6,5.

Na^+ -зависимое дыхание Ba_1 очень чувствительно к HQNO [332]. Есть ряд указаний, что место взаимодействия ионов Na^+ с NADH-хинонредуктазой Ba_1 и *V. alginolyticus* локализовано на стадии восстановления семихинона в гидрохинон [832, 1537]. Высказана гипотеза, что в процессе своего транспорта ион Na^+ соединяется с анион-радикалом Q^- и образующийся электронейтральный комплекс $\text{Na}^+ \cdot \text{Q}^-$ переносится через гидрофобный слой мембраны [832]. Продолжая эту логику, можно предположить, что также и некоторые другие хинонзависимые преобразователи энергии способны участвовать в транспорте Na^+ . В этой связи следует иметь в поле зрения фотосинтетическую редокс-цепь¹.

В литературе можно найти целый ряд наблюдений о стимулирующем действии Na^+ на дыхание морских щелоче- или солеустойчивых бактерий (см. обзоры: [132, 842]). Однако требуются дальнейшие опыты, чтобы выяснить, нужен ли Na^+ как аллостерический активатор или как транспортируемый ион. В этой связи представляется весьма заманчивым продолжить одну из первых работ, описывавших Na^+ -стимулируемое дыхание. Мы имеем в виду публикацию Кодамы и Танигуси [864, 865], показавших, что у негалофильного *Pseudomonas stutzeri* ион Na^+ необходим для: 1) роста в любых условиях, 2) максимальной скорости дыхания, 3) импорта K^+ , глутамата, лейцина и фосфата и 4) подвижности. К сожалению, у авторов не было мысли о возможной роли Na^+ как сопрягающего иона и транспорт Na^+ остался неисследованным.

¹ Как было показано Беккером и Брандом [234], у *Anacystis nidulans* и других цианобактерий существует особое место в фоточени, для функционирования которого абсолютно необходим катион. Это место локализовано в фотосистеме II или сразу после нее, т. е. там, где принимает электроны пластохинон. Среди испробованных катионов эффективными оказались только Na^+ и Ca^{2+} . Поскольку действующие концентрации двух катионов были близки ($0,5-1 \cdot 10^{-5}$ М), а ионов натрия в цитоплазме гораздо больше, чем кальция, мы можем заключить, что природным катионом-активатором служит Na^+ , а не Ca^{2+} . В нашей группе И. И. Броуном и др. [30, 311, 312] была показана необходимость Na^+ для фотосинтеза, движения и генерации ΔΨ на цитоплазматической мембране щелоче- и солеустойчивой цианобактерии *Oscillatoria brevis*.

По данным Миллера и соавт. [1033], рост и фотосинтез другой алкало-толерантной цианобактерии *Synechococcus leopoliensis* также требуют Na^+ . Необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопрос, имеют ли описанные выше эффекты отношение к проблеме транспорта ионов Na^+ .

7.1.3. Na^+ -транспортирующие АТРа́зы

7.1.3.1. Бактериальные Na^+ -АТРа́зы

В 1982 г. Хифнер и Харольд [702] представили убедительные свидетельства существования Na^+ -транспортирующей АТРа́зы у *Streptococcus faecalis*. Было показано, что вывернутые субклеточные пузырьки из *S. faecalis* отвечают на добавку Na^+ стимуляцией своей АТРазной активности. Радиоактивный Na^+ накапливался в пузырьках сопряженно с гидролизом АТР. Na^+/H^+ -антипорт, описанный ранее в той же группе при исследовании пузырьков из *S. faecalis*, мог бы быть отчасти артефактом из-за переваривания Na^+ -АТРа́зы протеолитическими ферментами этих бактерий в процессе их разрушения [702].

Недавно Киношита и соавт. [852] получили очень интересные результаты, указывающие на энергизацию мембраны *S. faecalis* посредством Na^+ -АТРа́зы в условиях, когда невозможна H^+ -энергетика. В первой серии опытов был найден мутант, дефицитный по H^+ -АТРа́зе. Его общая АТРазная активность составляла всего 30% от контроля. Что касается Na^+ -АТРа́зы, то ее вклад резко возрос: активность этого фермента была в 40 раз больше у мутанта, чем у исходного штамма. Подобно Na^+ -дыхательной цепи *V. alginolyticus* и Ba_1 , Na^+ -АТРа́за *S. faecalis* была наиболее активной в щелочной среде (pH 8,0–9,0).

В следующей серии экспериментов было показано, что количество Na^+ -АТРа́зы может быть повышено и у дикого штамма *S. faecalis*, если бактерии растить в присутствии ионов Na^+ и $2 \cdot 10^{-5}$ М ХКФ. В этих условиях Na^+ -АТРа́за достигала уровня 75% от того, что наблюдался у мутанта. Исключение Na^+ из состава среды роста предотвращало индукцию Na^+ -АТРа́зы [852]. Недавно этот результат был подтвержден Какинуемой и Харольдом [805]. Авторы также сообщили, что Na^+ необходим для аккумуляции K^+ мутантом *S. faecalis*. Они предположили, что Na^+ -АТРа́за бактерии осуществляет антипорт Na^+ и K^+ , подобно Na^+/K^+ -АТРа́зе животных клеток. Однако в отличие от животного фермента, Na^+ -АТРа́за *S. faecalis* не активируется ионами K^+ . Поэтому более правдоподобное объяснение состоит в том, что перенос K^+ осуществляется K^+ -унипортером (или K^+ -каналом) под действием ΔΨ, образуемой Na^+ -АТРа́зой.

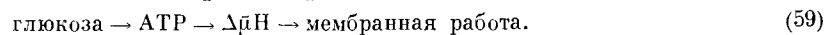
Два свойства Na^+ -АТРа́зы *S. faecalis* существенны в настоящем контексте.

1. Она индуцируется в условиях, когда энергизация бактериальной мембраны посредством H^+ -АТРа́зы оказывается невозможной из-за мутации или повышения H^+ -проводимости разобщителем.

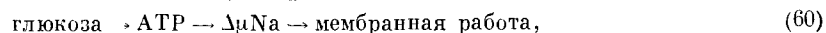
2. Na^+ -АТРа́за требует щелочных условий для получения максимальной активности.

К сожалению, авторы не исследовали возможность индукции Na^+ —АТРаза щелочными условиями среды. Такая индукция представляется вероятной, так как H^+ —АТРаза, альтернативный фермент, энергизующий мембрану *S. faecalis*, репрессируется при росте в щелочной среде [863]. Репрессия сопровождается потерей α -субъединицы фактора F_1 [150].

Приняв во внимание все наблюдения, описанные выше, мы можем предположить, что биологическая функция Na^+ —АТРаза *S. faecalis* состоит в энергизации мембраны этой гликолизирующей бактерии в условиях, когда невозможно использовать обычную цепь событий, имеющих результатом накопление метаболитов и другие типы мембранной работы:



В отсутствие $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ реализуется альтернативный механизм:



где второй и третий этапы катализируются соответственно Na^+ —АТРазой и Na^+ -зависимыми портерами.

Механизм подобного типа описан группой Селуина [1011, 1012] у *Exiguobacterium aurantiacum*. Этот факультативный алкалофил располагает первичным Na^+ -насосом, откачивающим Na^+ из клетки за счет энергии гликолиза. Простейшее предположение состоит в том, что транспорт Na^+ осуществляется Na^+ —АТРазой.

Путь, включающий Na^+ —АТразу, по-видимому, имеется у *Mycoplasma* и *Acholeplasma*. По Леблану и др. [241, 242], *Mycoplasma mycoides* располагает двумя механизмами откачки Na^+ : Na^+/H^+ -антипортом, использующим $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, и $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -независимым Na^+ -унипортом (или Na^+/K^+ -антипортом), обеспечиваемым энергией АТР. В той же микоплазме была обнаружена АТРаза, активируемая ионами Na^+ . Ванадат, оубаин, а также K^+ не влияли на эту АТразу. Подобный фермент был описан у *Acholeplasma laidlawii* [372, 604, 776, 931]. АТРаза *A. laidlawii* содержит 5 типов субъединиц, массы которых близки к таковым в факторе F_1 . Подобно этому фактору, АТРаза *A. laidlawii* инактивируется на холоду. В то же время она не чувствительна к ауовертину, специфическому ингибитору фактора F_1 [372, 931].

Недавние сообщения о Na^+ —АТРазае в клетках *Propionigenum modestum* и метанобактерий будут описаны ниже, когда пойдет речь о $\Delta\bar{\mu}\text{Na}^+$ -зависимом синтезе АТР (раздел 7.2.3.1).

7.1.3.2. Na^+/K^+ —АТРаза и Na^+ —АТРаза животных

Na^+/K^+ —АТРаза, описанной в 1957 г. Скоу [1391, 1392], посвящено большое количество исследований. Фермент локализован во внешней мембране животной клетки. Он ответствен за генерацию $\Delta\psi$, $\Delta\mu\text{Na}$ и $\Delta\mu\text{K}$ на этой мембране. Такой эффект достигается

путем обмена $2\text{K}^+_{\text{наруж}}$ на $3\text{Na}^+_{\text{внутр}}$, сопряженного с гидролизом одной молекулы АТР. Na^+/K^+ —АТРаза имеет массу порядка 550 кДа и состоит из 4 субъединиц двух типов (2 α и 2 β). Массы субъединиц равны соответственно 95 и 45 кДа [997, 1339]. По данным Ю. А. Овчинникова и сотр. [51, 458, 1150], полученным посредством электронного микроскопирования двумерных кристаллов фермента (разрешение 2 нм), вертикальный размер $\alpha\beta$ -протомера около 10 нм, что больше толщины липидного бислоя. α -Субъединица выдвигается из мембраны по обе ее стороны, в то время как β -субъединица экспонирована на внешней стороне мембраны. N-концевой участок β -субъединицы гликозилирован. Масса углеводной части равна 7 кДа [51]. По данным, полученным в опытах с химической модификацией и антителами, почти две трети α -субъединицы находится вне мембраны, причем цитоплазматический домен втрое больше того, который выступает снаружи клетки. α -Субъединица суживается в своей центральной части, погруженной в мембрану. Именно здесь две α -субъединицы контактируют между собой на протяжении 3 нм [1150].

Na^+/K^+ —АТРаза встроена в протеолипосомы, способные к АТР-зависимому антипорту Na^+ и K^+ . Как показал метод травления замороженных образцов, протеолипосомы содержат частицы размером 9—12 нм, что примерно соответствует высоте $\alpha_2\beta_2$ -комплекса.

Была выяснена аминокислотная последовательность Na^+/K^+ —АТРаза. Анализ профилей гидрофобности свидетельствует о наличии семи α -спиральных колонн в α -субъединице и четырех в β -субъединице [93, 104, 105, 107, 1151, 1339].

N-концевой домен α -субъединицы смотрит в цитоплазму. Карбоксил одной из дикарбоновых аминокислот, локализованных в этом домене, фосфорилируется посредством АТР при образовании фосфофермента в процессе АТРазной реакции [1339].

Механизм Na^+/K^+ —АТРаза описывается в рамках общей схемы E_1E_2 —АТРаз:



Согласно схеме, ионы Na^+ (по всей вероятности, $\text{Na}^+_{\text{внутр}}$) необходимы для фосфорилирования фермента. Фосфофермент претерпевает конформационное изменение ($\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$) и распадается на E_2 и фосфат в присутствии ионов калия ($\text{K}^+_{\text{наруж}}$). Затем E_2

релаксирует в E_1 . Состояние E_2P фиксируется оуабаином. Олигомицин влияет на состояния E_1 и E_1P , стимулируя связывание Na^+ (K_d для Na^+ снижается с 340 до 60 мкМ). При этом K_d для K^+ не изменяется (6 мкМ). Имеется положительная кооперативность в связывании $3Na^+$ и $2K^+$ (см. обзор: [1997]).

Pb^{2+} , Cs^+ , NH_4^+ , Tl^+ , Li^+ , Na^+ могут, хотя и в разной степени, заменять ион K^+ . Что касается иона Na^+ , то его роль более специфична. Среди перечисленных катионов только Li^+ может использоваться вместо Na^+ , причем скорость гидролиза АТР снижена, а сродство фермента к Li гораздо меньше, чем к Na^+ . Интересно, что Na^+ можно заменить ионом водорода, причем H^+ имеет по крайней мере на два порядка *большее* сродство к Na^+ , K^+ —АТРаза, чем Na^+ . Тот факт, что фермент в физиологических условиях переносит Na^+ , а не H^+ , обусловлен гораздо большей концентрацией Na^+ , чем H^+ в цитоплазме. Однако в более кислых средах (рН 5,7) удается наблюдать H^+/K^+ -антипорт и АТРаза активностью без Na^+ [676]. Возможное значение этого обстоятельства мы обсудим ниже (см. раздел 7.2.3).

Другая Na^+ -транспортирующая АТРаза была описана Провербио, Дель Кастилло и их коллегами в базолатеральных мембранах из клеток эпителия тонкого кишечника [456] и проксимальных почечных канальцев [989, 1215, 1216]. Она отличается от Na^+/K^+ —АТРАЗы. Прежде всего для активности не нужен K^+ . Фукоземид тормозит фермент, в то время как оуабаин не влияет. На Na^+/K^+ —АТРаза фукоземид не действует. Na^+ активирует гидролиз АТР. Среди других катионов активен только Li^+ , хотя и в меньшей степени, чем Na^+ . В противоположность Na^+/K^+ —АТРаза фермент стимулируется микролярными концентрациями Ca^{2+} . Он отличается от Na^+/K^+ —АТРАЗы по рН-оптимуму и K^+ для Na^+ . Авторы назвали обнаруженную активность Na^+ —АТРазой и предположили, что она ответственна за оуабаинустойчивую фракцию транспорта Na^+ в животных клетках.

7.2. Утилизация $\Delta\mu Na$, образуемой первичными $\Delta\mu H$ -генераторами

7.2.1. Осмотическая работа

7.2.1.1. Na^+ , метаболит-симпортеры

У алкалотолерантной *V. alginolyticus*, располагающей Na^+ —NADH-хинонредуктазой, обнаружены Na^+ , метаболит-симпортеры, ответственные за аккумуляцию 19 аминокислот и сахарозы [807, 1509]. Наиболее детально изучен транспорт α -аминоизобутирата (АИБ). Показано, что, во-первых, Na^+ необходим для аккумуляции АИБ, во-вторых, дыхание может поставлять необхо-

димую энергию и, в-третьих, аккумуляция АИБ устойчива к ротонифору п [1509]. Na^+ , АИБ-симпортер описан также у *V. costicola* [673, 893].

Показано также, что накопление K^+ в клетках *V. alginolyticus* при щелочных рН поддерживается энергией $\Delta\psi$, генерируемой Na^+ —NADH-хинонредуктазой. При рН $\geq 8,0$ Na^+ -зависимый импорт K^+ снижает $\Delta\psi$ без образования $\Delta\mu H$ [1508].

Na^+ -зависимое накопление метаболитов в алкалофильных бактериях было описано в ряде сообщений [657, 658, 660, 853, 854, 880, 888, 1471]. Однако остается неясным, как эти алкалофилы образуют $\Delta\mu Na$. Авторы постулируют, что $\Delta\mu H$ служит источником энергии для генерации $\Delta\mu Na$ (см., однако, ниже раздел 7.2.1.2). В любом случае следует подчеркнуть, что в доступной литературе нам не удалось найти сообщений о Na^+ -независимом импорте метаболитов в алкалофильные или алкалотолерантные бактерии при щелочных значениях рН.

Нейтрофильные бактерии, живущие при низких или умеренных концентрациях $NaCl$, обычно используют H^+ , а не Na^+ в качестве симпортера иона (см. выше раздел 5.2.7.4). Однако есть и исключения из этого правила. Так, пролин транспортируется вместе с Na^+ в клетки *Mycobacterium phlei* [917], *Salmonella typhimurium* [339] и *E. coli* [370, 1453].

Интересный «дуалистический» механизм импорта метаболита был описан у *E. coli*. Оказалось, что эта бактерия использует альтернативно H^+ или Na^+ в качестве сопрягающего катиона при аккумуляции меллибиозы [230, 1493, 1526]. По Димроту и Томер [475], поглощение цитрата бактериями *Klebsiella pneumoniae* осуществляется переносчиком, обеспечивающим симпорт цитрата³⁻, $2Na^+$ и $2H^+$. Это означает, что движущей силой процесса должны быть $\Delta\psi$, $\Delta\mu Na$ и $\Delta\mu H$. Попав в цитозоль, цитрат превращается в ацетат и оксалоацетат. Последний расщепляется Na^+ -транспортирующей декарбоксилазой с образованием $\Delta\psi$ и $\Delta\mu Na$. Продуктами реакции служат пируват и HCO_3^- . Затем пируват катаболизируется до формата.

Таким образом, конечными продуктами сбраживания цитрата оказываются CH_3COO^- , HCO_3^- и $HCOO^-$. По мысли авторов, выход этих анионов из клетки происходит путем их симпорта с H^+ , что должно приводить к генерации $\Delta\mu H$ (аналогичный процесс действительно описан у гликолизирующих бактерий, которые образуют лактат — см. раздел 5.2.4).

Броди и соавт. [917] удалось выделить Na^+ , пролин-симпортер из *M. phlei*, который оказался белком массой 20 кДа. Очищенный симпортер был реконструирован с фосфолипидами. Полученные протеолипосомы транспортировали пролин за счет $\Delta\psi$, образованной диффузией ионов K^+ . Аккумуляция пролина тормозилась протонофорами, снижавшими $\Delta\psi$, а также сульфгидрильными реагентами.

(О растворении и реконструкции Na^+ -зависимой системы из *Pseudomonas aeruginosa*, транспортирующей аминокислоты с разветвленной боковой цепью, см.: [1540].)

Частичная очистка и реконструкция Na^+ -аспартат-симпортера из галофильной *Halobacterium halobium* была недавно описана Грином и Мак-Дональдом [642]. Вообще морские и галофильные микроорганизмы, подобно алкалофильным, обычно используют Na^+ , а не H^+ как симпортируемый ион. Это верно также и для внешней мембраны клеток высших животных, омываемой раствором с высокой концентрацией NaCl . Данное обстоятельство — еще одно свидетельство справедливости мнения о том, что кровь — частичка океана в нашем теле. Генераторами $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ на плазмалемме животных клеток служит Na^+/K^+ -АТРаза (а в некоторых случаях также и Na^+ -АТРаза). Образованная $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ утилизируется различными переносчиками, транспортирующими в клетку аминокислоты, сахара, жирные кислоты и другие соединения (см. обзоры: [735, 741, 816, 1583]). Некоторые из этих Na^+ -метаболиз-симпортеров выделены и встроены в протеолипосомы (см., например, [866, 1348]).

Неожиданное наблюдение было сделано при изучении Na^+ -глюкоза-симпортера в адипоцитах. Как оказалось, этот переносчик присутствует не только во внешней мембране, но и в каких-то пузырьках, локализованных в цитоплазме животной клетки. Эти пузырьки, по-видимому, играют роль депо переносчика. Добавление инсулина ($1 \cdot 10^{-10}$ М) вчетверо увеличивает количество переносчика во внешней мембране адипоцита, причем эффект гормона развивается всего за 2,5 мин. Последующее промывание клеток раствором антител к инсулину вызывает снижение уровня Na^+ -глюкоза-симпортера в этой мембране [1583].

Некоторые животные клетки содержат H^+ -АТРаза во внешней мембране (см. выше раздел 4.5.2). В этих клетках описаны H^+ -метаболиз-симпортеры (см., например, [918]).

7.2.1.2. Ионы Na^+ и регуляция внутриклеточного pH

Бактерии весьма успешно решают проблему гомеостаза внутриклеточного pH. Как было показано в группе Макнаба [1428], у *E. coli* этот гомеостаз наблюдается при $\text{pH}_{\text{наруж}}$ 5,5–9,0. В указанном интервале $\text{pH}_{\text{наруж}}$ величина $\text{pH}_{\text{внутр}}$ описывается уравнением

$$\text{pH}_{\text{внутр}} = 7,5 - 0,1 (\text{pH}_{\text{наруж}} - 7,6), \quad (65)$$

так что значения $\text{pH}_{\text{внутр}}$ при $\text{pH}_{\text{наруж}}$ 5,5 и 9,0 равны соответственно 7,4 и 7,8.

При понижении $\text{pH}_{\text{наруж}}$ закисление цитоплазмы может быть предотвращено посредством импорта K^+ , разменивающего образующую $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератором $\Delta\bar{\Psi}$ на $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ нужного направления (цитоплазма щелочнее внешней среды) (рис. 117, а).

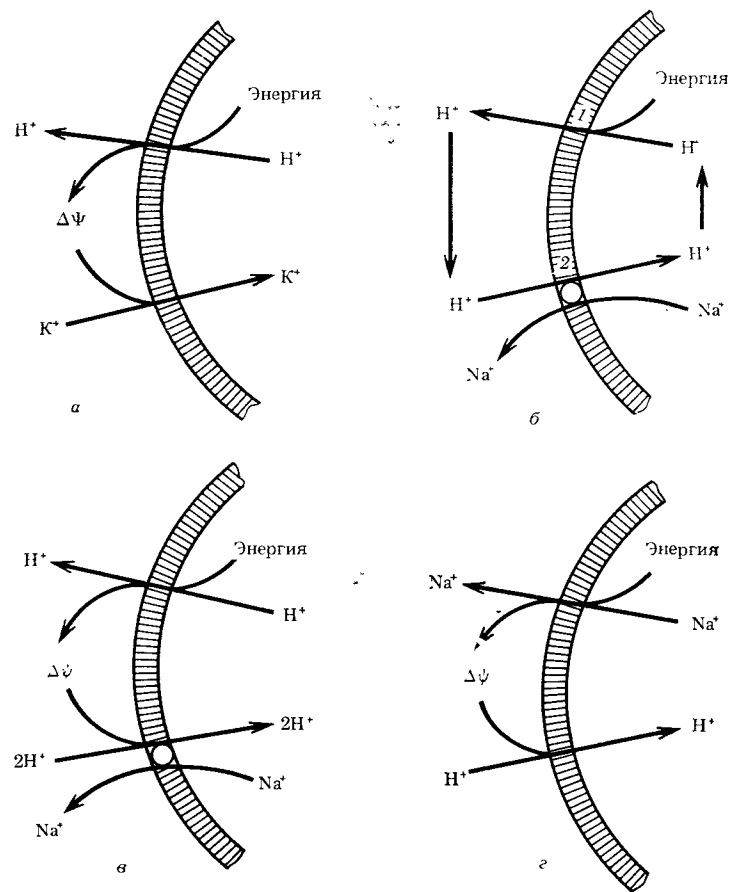


Рис. 117. Возможные механизмы стабилизации pH в цитоплазме бактерий

а — $[\text{H}^+]_{\text{наруж}} > [\text{H}^+]_{\text{внутр}}$; $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератор выбрасывает ионы H^+ из клетки и образует $\Delta\bar{\Psi}$ (верхняя реакция). Эта $\Delta\bar{\Psi}$ разряжается потоком K^+ в клетку (нижняя реакция), так что образуется $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ нужного знака (цитоплазма защелачивается);

б — $[\text{H}^+]_{\text{наруж}} \approx [\text{H}^+]_{\text{внутр}}$; потеря клеткой ионов H^+ из-за работы $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов (реакция 1) компенсируется входом H^+ извне в обмен на Na^+ (реакция 2);

в, г — $[\text{H}^+]_{\text{наруж}} < [\text{H}^+]_{\text{внутр}}$; в — H^+ -помпа откачивает H^+ из цитоплазмы, генерируя $\Delta\bar{\Psi}$ (верхняя реакция). Эта $\Delta\bar{\Psi}$ используется Na^+/H^+ -антипортером, обменивающим один Na^+ на два H^+ (нижняя реакция); г — первичная Na^+ -помпа заряжает мембрану, откачивая Na^+ во внешнюю среду (верхняя реакция). Унипорт H^+ в клетку разряжает $\Delta\bar{\Psi}$ и подкисляет цитоплазму (нижняя реакция)

При нейтральном $\text{pH}_{\text{наруж}}$ единственная задача — вернуть в цитоплазму ионы H^+ , теряемые клеткой из-за работы $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов. Проблема может быть решена посредством электронейтрального Na^+/H^+ -антипорта (рис. 117, б).

Электронейтральный Na^+/H^+ -антипорт эффективен в поддержании рН-гомеостаза только при условии, что $\text{pH}_{\text{наруж}} \leq \text{pH}_{\text{внутр}}$. Иные механизмы закисления цитоплазмы оказываются необходимыми, если $\text{pH}_{\text{наруж}}$ выше, чем $\text{pH}_{\text{внутр}}$. Бактерия сталкивается с этой проблемой, когда среда роста становится щелочной. Теперь электронейтральный Na^+/H^+ -антипорт уже не может обеспечивать вход H^+ в клетку, так как градиенты рН и рNa неблагоприятны для такого процесса. Один из способов предотвратить защелачивание цитоплазмы при высоком $\text{pH}_{\text{наруж}}$ — это сделать Na^+/H^+ -антипорт электрогенным (например, обмен одного Na^+ на два H^+). Если при этом $\Delta\psi$, образуемая ΔpH -генератором, достаточно высока, чтобы перекрыть неблагоприятное действие ΔpH и ΔpNa , то взаимодействие ΔpH -генератора и $\text{Na}^+ 2\text{H}^+$ -антипортера будет поддерживать $\text{pH}_{\text{внутр}} < \text{pH}_{\text{наруж}}$ (рис. 117, в). Следует отметить, что электронейтральный и электрогенный Na^+/H^+ -антипортеры не могут действовать одновременно, иначе произойдет рассеяние ΔpH [354].

Альтернативная возможность показана на рис. 117, г. Здесь первичный ΔpNa -генератор заряжает мембрану, а H^+ -унипортер облегчает электрофорез ионов H^+ под действием образованной $\Delta\psi$. Количественные измерения, проведенные Гуффанти и сотр. [660], находятся в хорошем соответствии с последней схемой. Было найдено, что при $\text{pH}_{\text{наруж}} 11,5$ $\text{pH}_{\text{внутр}}$ равно 9,0 а $\Delta\psi$ около 160 мВ, т. е. ΔpH примерно соответствует величине $\Delta\psi$, как то и должно быть по схеме г на рис. 117. (Следует, однако, отметить, что Гуффанти и его коллеги предпочитают объяснять свои данные в рамках схемы в на рис. 117 [656, 887]).

Каждый из двух процессов, показанных на рис. 117, г, уже описан в тех или иных биомембранах. Так, ΔpNa -генераторы, использующие энергию дыхания, гидролиза АТФ или декарбонирования, обнаружены у определенных прокариот (см. выше раздел 7.1). Что касается H^+ -унипорта, также фигурирующего на схеме г (см. рис. 117), то он продемонстрирован во внутренней мембране митохондрий мышц и бурого жира животных, адаптированных к холоду (см. обзоры [126, 1108] и раздел 5.4.2). (О регуляции рН у бактерий см. также ниже раздел 7.3.)

Ионы Na^+ участвуют также в рН-гомеостазе животных и растительных клеток. У животных твердо установлено, что именно Na^+/H^+ -антипорт ответствен прежде всего за постоянство внутриклеточного рН. Эта система будет обсуждаться ниже в разделе 7.5. У растений Na^+/H^+ -антипорт происходит как во внешней мембране клетки, так и в тонопласте [272, 1197]. Изучение последней системы показало, что антипорт чувствителен к амилориду, подобно тому как это имеет место у животных [32] и бактерий [1197].

7.2.2. Механическая работа

Существует по крайней мере один пример, когда механическая работа совершается за счет ΔpNa , образуемой первичным Na^+ -насосом. Как было показано в нашей группе П. А. Дибровым, движение *V. alginolyticus*: 1) наблюдается только в присутствии Na^+ , 2) может поддерживаться искусственно созданной ΔpNa (но не ΔpH), причем моненсин снимает этот эффект, и 3) происходит, хотя и со сниженной скоростью, в присутствии высокой концентрации протонофора ($1 \cdot 10^{-4}$ М ХКФ). В 100 раз меньшая концентрация ХКФ полностью подавляет движение, если добавить моненсин. В отсутствие ХКФ моненсин лишь слегка снижает скорость движения, поддерживаемого дыханием. Было сделано заключение, что флаголярный мотор *V. alginolyticus* использует энергию ΔpNa , а не ΔpH [131, 376, 464, 465, 1416—1418].

Na^+ -зависимое движение показано также у алкалофильных бацилл, а именно у *Bacillus* sp. YN-1 и *Bacillus firmus* [729, 730, 754, 853, 1469—1471]. На *Bacillus* sp. YN-1, изученной более детально, показано, что Na^+ необходим для движения, которое лишь частично тормозится протонофором. Продемонстрировано также, что ΔpNa и $\Delta\psi$, генерируемые энзиматически, эквивалентны друг другу в качестве источников энергии для движения. К сожалению, механизм образования ΔpNa этими микроорганизмами остается неясным. Та же неопределенность имеет место и в случае *Pseudomonas stutzeri*, у которого впервые была отмечена потребность в Na^+ для движения [865].

Сравнительное исследование Na^+ - и H^+ -моторов выявило ряд существенных различий. Так, было найдено, что зависимость скорости движения от ΔpNa имеет порог в области 100 мВ, ниже которого бактерии неподвижны [729]. Эта величина значительно выше той, что была описана для ΔpH -зависимого движения некоторых нейтрофилов. Высокий порог характерен также для Na^+ -мотора *V. alginolyticus* [464]. В последнем случае это может быть вызвано тем обстоятельством, что ротор (М-диск) оказался меньшего диаметра, чем другие диски, в то время как диаметр М-диска H^+ -моторов равен или больше такового других дисков [11, 99, 207].

По аминокислотному составу флагеллин алкалофильной *B. firmus* и флагеллин нейтрофилов подобны, за тем исключением, что в первом случае содержание основных аминокислот ниже [659].

Специальное внимание следует уделить сравнительному изучению энергетики различных видов *Vibrio*, так как среди них есть эпидемиологически весьма важный *Vibrio cholerae*. Как было отмечено в нашей группе П. А. Дибровым, движение *V. cholerae* и морского *V. harveyi* имеет характеристики Na^+ -мотора, подобного *V. alginolyticus*. Феррис и соавт. [557] описали структуру базального тела флагеллы *V. cholerae*. Было выявлено полное сходство с таковой *V. alginolyticus* (см. выше раздел 5.3.1).

Хорошо известно, что *V. cholerae* образует токсин, вызывающий выброс соли из тканей в кишечник. Может быть, эта соль необходима *V. cholerae* для Na^+ -энергетики этого вибриона. (Относительно Na^+ -энергетики *V. costicola* и *V. parahaemolyticus* см. выше раздел 7.1.2.)

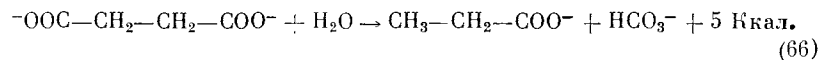
7.2.3. Химическая работа

Как уже отмечалось в разделе 7.1.1, две Na^+ -транспортирующие декарбоксилазы, встроенные в одну протеолипосому, могут быть сопряжены посредством $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, так что декарбоксилирование одного субстрата ведет к карбоксилированию другого. В этой модельной системе $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ выполняет химическую работу. Однако наиболее важным видом химической работы, совершаемой сопрягаемыми мембранами, служит синтез АТФ. Вот почему демонстрация фосфорилирования АДФ неорганическим фосфатом за счет энергии $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ считалась центральной задачей исследований по натриевой энергетике [685].

Еще в 1966 г. Глин и Гаррахан [619, 930] доказали принципиальную возможность того, что $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ (вместе с $\Delta\bar{\mu}\text{K}$) способна повернуть вспять реакцию гидролиза АТФ, катализируемую ионотранспортной АТФазой. Авторы описали синтез АТФ эритроцитами в условиях, когда $[\text{Na}^+]_{\text{внутри}} > [\text{Na}^+]_{\text{наруж}}$ и $[\text{K}^+]_{\text{внутри}} < [\text{K}^+]_{\text{наруж}}$. Однако такая реакция вряд ли происходит *in vivo* из-за противоположной направленности ионных градиентов.

7.2.3.1. $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -зависимый синтез АТФ у анаэробных бактерий

Некоторые указания на превращение энергии $\Delta\bar{\mu}\text{Na} \rightarrow \text{АТФ}$ в естественных условиях были получены Димротом и его коллегами [472, 722], изучавшими *Propionigenum modestum*, строго анаэробную бактерию, описанную в 1982 г. Шинком и Пфенигом [1317]. Единственным источником полезной энергии для *P. modestum* служит декарбоксилирование сукцината в пропионат:



Энергетический выход этой реакции примерно вдвое ниже, чем цена энергии синтеза АТФ из АДФ и фосфата при физиологических условиях. (Это послужило поводом для Шинка и Пфенига дать видовое название вновь открытому микробу *modestum*, т. е. умеренный — в смысле энергетических потребностей.) Ясно, что механизмы субстратного фосфорилирования не могут быть использованы *P. modestum*, так как все они предполагают образование одной молекулы АТФ на одну молекулу утилизированного субстрата. Решением проблемы могла бы быть генерация $\Delta\bar{\mu}\text{H}$

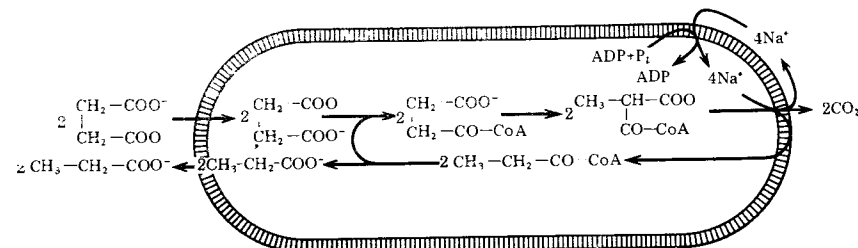


Рис. 118. Предполагаемый механизм энергообеспечения анаэробной бактерии *Propionigenum modestum*

Сукцинат входит в клетку, где превращается в сукцинил-КоА посредством переацилирования с пропионил-КоА. Из сукцинил-КоА образуется метилмалонил-КоА. Последний декарбоксилируется до пропионил-КоА и CO_2 , что сопряжено с откачкой из клетки ионов Na^+ . Откаченные ионы Na^+ возвращаются в цитоплазму через Na^+ -АТФ-синтазу, образующую АТФ из АДФ и фосфата. Стехиометрия Na^+ : субстрат для декарбоксилазы меньше, чем для H^+ -АТФ-синтазы (по: Хильперт и др. [722] и Димрот и Хильперт [472])

или $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ при декарбоксилировании сукцината, если предположить, что на каждый декарбоксилированный сукцинат из клетки откачивается $n\text{Na}^+$ или $n\text{Na}^+$, а синтез одной молекулы АТФ сопряжен с переносом $2n\text{H}^+$ ($2n\text{Na}^+$) назад в клетку.

По Димроту и соавт. [722], декарбоксилирование метилмалонил-КоА (интермедиата превращения сукцината в пропионат) сопряжено с откачкой ионов Na^+ из цитоплазмы *P. modestum* (см. выше раздел 7.1.1). Предполагается, что образования $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ используется для синтеза АТФ путем обращения Na^+ -АТФазы, которая была обнаружена в больших количествах в мембране *P. modestum* (рис. 118). Как сообщил Димрот, эта АТФаза похожа по субъединичному составу на F_0F_1 . Она чувствительна к ДЦКД, будучи связанной с мембраной, и утрачивает эту чувствительность, как и способность активироваться ионами Na^+ , после отделения от мембраны [471, 472].

Чтобы проверить схему, представленную на рис. 118, авторы исследовали вывернутые субклеточные пузырьки *P. modestum* [722, 723]. Было найдено, что как декарбоксилирование метилмалонил-КоА, так и гидролиз АТФ сопряжены с накоплением Na^+ внутри пузырьков. АТФ-зависимое поглощение Na^+ тормозилось $5 \cdot 10^{-5}$ М моненсином и было устойчиво к $5 \cdot 10^{-5}$ М ХКФ (рН 7,0). Дальнейшие опыты показали, что $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, образуемая декарбоксилазой, может поддерживать синтез АТФ. Моненсин тормозил процесс. К сожалению, степень сопряжения декарбоксилирования и фосфорилирования в пузырьках оказалась очень низкой: скорость синтеза АТФ была в 10^4 раз медленнее скорости декарбоксилирования. Кроме того, АТФазная активность была в 10^3 раз большей, чем АТФ-синтазная. Поэтому наблюдения Димрота и соавт. можно рассматривать лишь как качествен-

ное указание в пользу $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -зависимого фосфорилирования, а не как окончательное доказательство этого процесса.

Тем не менее вся логика этой работы, а также ряд фактов, косвенно имеющих отношение к делу, свидетельствуют о справедливости заключения, сделанного авторами: 1) *P. modestum* должен иметь какой-то механизм синтеза АТР, сопряженный с превращением сукцината в пропионат, поскольку эта реакция — единственный источник энергии для жизнедеятельности данного микроба; 2) твердо установлено, что энергия, освобождающаяся при декарбоксилировании, используется для образования $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$; 3) Na^+ вызывает 20-кратную активацию мембранной АТФазы; 4) АТР поддерживает чувствительный к монансину транспорт Na^+ в субклеточные пузырьки или Na^+ —АТФазные протеолипосомы. Этот транспорт резко стимулируется протонофором ХКФ или валиномицином и K^+ ; 5) гидролиз АТР может быть сопряжен с $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -зависимым карбоксилированием пропионата в метилмалонил- CoA [471, 472].

$\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -независимый синтез АТР, поддерживаемый искусственно созданной $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, был продемонстрирован в опытах с другим типом анаэробных микробов — метанообразующими бактериями. В 1983 г. Шенхайт и Перски [1335] сообщили, что вызванный валиномицином выход K^+ из клеток *Methanobacterium thermoautotrophicum* приводит к возрастанию уровня внутриклеточного АТР. Эффект сильно стимулировался ионами Na^+ [1335] или Li^+ [1332]. По мнению авторов, одно из возможных объяснений наблюдавшегося эффекта состоит в том, что $\Delta\bar{\Psi}$, генерируемая на выходе ионов K^+ , используется для обращения гипотетической Na^+ —АТФазы. Однако Шенхайту и Перски не удалось обнаружить стимулирующего действия ионов Na^+ на АТФазную активность мембранной фракции исследованной бактерии [1335].

В 1985—1986 гг. наблюдение Шенхайта и Перски было подтверждено Ланкастером и сотр., работавшими с другой метаногенной бактерией, *Methanococcus voltae* [155, 411, 903]. Было показано, что синтез АТР может быть вызван диффузионным потенциалом ионов K^+ с валиномицином или ионов H^+ в присутствии разобщителя-протонофора SF 6847. В последнем случае к бактериям, инкубированным с разобщителем при кислом pH, добавляли КОН. Выход H^+ из клетки, катализируемый разобщителем, должен был создавать $\Delta\bar{\Psi}$ (внутри клетки знак «минус»). Было постулировано, что наблюдавшийся в ответ на защелачивание АТР синтез происходил за счет этой $\Delta\bar{\Psi}$ (рис. 119). В соответствии с этой интерпретацией было показано, что Na^+ необходим для синтеза АТР в присутствии разобщителя, а K^+ и валиномицин, разряжающие диффузионный потенциал ионов H^+ , прекращали этот синтез [411]. Дальнейшие опыты продемонстрировали, что добавление NaCl к бактериям в безнатриевой среде также вызывает синтез, причем этот эффект снимается монансином [346, 903]

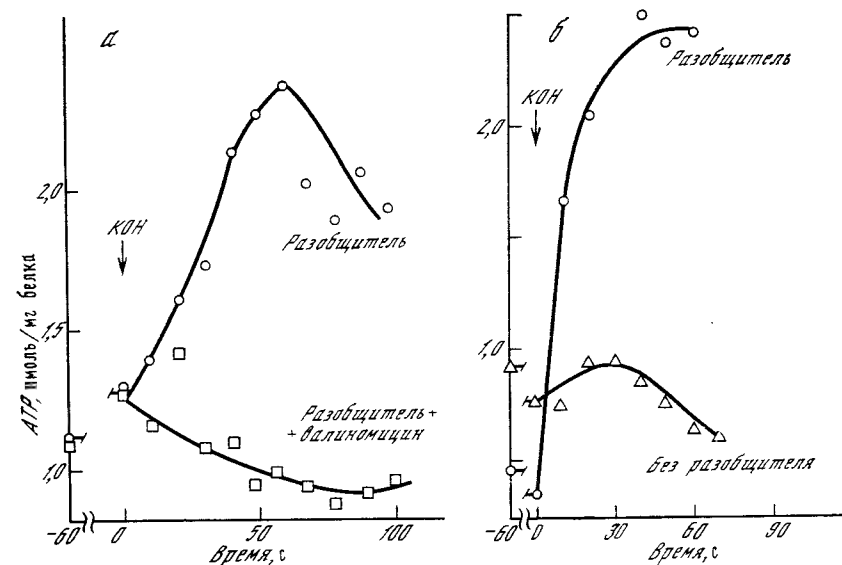
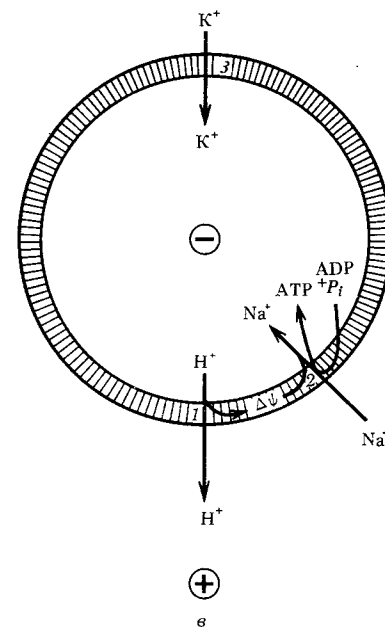


Рис. 119. Синтез АТР, индуцированный разобщителем-протонофором в клетках *Methanococcus voltae*

а, б — клетки инкубировали при pH 5, после чего pH внезапно повышали до 7,9 добавкой КОН. В качестве разобщителя-протонофора использовали $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ SF 6847. (По: Крайдер и др. [411]); в — схема, поясняющая результаты, приведенные на рис. а и б; 1 — электрогенный выход H^+ по градиенту pH под действием протонофора; 2 — синтез АТР при обращении Na^+ —АТФазы под действием $\Delta\bar{\Psi}$, образованной процессом 1; 3 — поток K^+ , катализируемый валиномицином, сбрасывает $\Delta\bar{\Psi}$, которая образуется процессом 1, в результате чего тормозится синтез АТР



и диэтилстильбэстролом [903]. В тех же условиях диэтилстильбэстрол не влиял на фосфорилирование, сопряженное с метаногенезом [903].

Ланкастером и соавт. [155] было отмечено, что отношения, описанные для *M. voltae*, присущи также *Methanobacterium thermoautotrophicum* с тем лишь отличием, что синтез АТР на искусственно созданной $\Delta\psi$ оказался устойчивым к диэтилстильбэстролю. В то же время он тормозился хармалином, ингибитором ряда Na^+ -зависимых процессов.

Приведенные выше данные о синтезе АТР, требующем присутствия разобщителя-протонофора, служат доказательством того, что определенные виды бактерий имеют в своем распоряжении мембранный механизм синтеза АТР, альтернативный протонному фосфорилированию. К сожалению, остается неясным, использует ли *M. voltae* этот механизм для образования АТР в физиологических, а не модельных условиях. Сами авторы данной работы склонны рассматривать свое наблюдение лишь как свидетельство того, что *M. voltae* имеет Na^+ —АТРАЗу, функция которой сводится к откачке Na^+ из цитоплазмы этой морской солеустойчивой бактерии. Однако остается открытым вопрос, не участвуют ли ионы натрия в единственном процессе запасания энергии у метаногенных бактерий, а именно в фосфорилировании, сопряженном с образованием метана.

Показано, что Na^+ необходим для метаногенеза [1184, 1185] и сопряженного синтеза АТР [1335]. Было найдено [1333], что образование АТР при метаногенезе у *M. thermoautotrophicum* устойчиво к разобщителям и ДЦКД. Последний не тормозил также и синтез АТР на диффузионном потенциале ионов K^+ . Предположив, что метаногенез сопряжен с генерацией $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, мы могли бы найти место и для Na^+ —АТРАЗы, которая служила бы ферментом, использующим эту $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ для синтеза АТР.

Другая возможность состоит в том, что Na^+ нужен для метаногенеза как кофактор, а синтез АТР, сопряженный с образованием метана, организован по принципу субстратного фосфорилирования (именно этот вариант рассмотрен Ланкастером и др. [411, 902]). Что касается Na^+ —АТРАЗы, то она образует $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, необходимую для совершения осмотической работы. Как было установлено в группе Шпротта, многие аминокислоты транспортируются в *M. voltae* вместе с ионами Na^+ [527, 772].

Еще одно объяснение необходимости ионов Na^+ для метаногенеза было выдвинуто недавно Мюллером и др. [1082]. Авторы получили указание на то, что превращение метанола в метан включает энергозависимый окислительно-восстановительный процесс, поддерживаемый энергией $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ (см. также [269]).

7.2.3.2. «Натриевое» дыхательное фосфорилирование у *Vibrio alginolyticus*

Как мы уже отмечали, указание на Na^+ -зависимое дыхательное фосфорилирование было получено при изучении интактных клеток *Pseudomonas stutzeri* [865], хотя возможность того, что циркуляция Na^+ участвует в энергетическом сопряжении, в этой работе не рассматривалась.

Впервые подобного рода механизм был упомянут в 1981 г. Гуффанти и соавт. [657] как один из возможных способов синтеза АТР при дыхании алкалофильных бацилл. Однако исследование энергетики данных микробов привело авторов к мнению, что эти существа решают свои проблемы каким-то другим путем.

Недавно нам удалось продемонстрировать «натриевое» дыхательное фосфорилирование в клетках *V. alginolyticus*. На мысль о наличии такого процесса у этого вибриона нас навели опыты по движению. Оказалось, что KCN или анаэробноз парализуют клетки *V. alginolyticus*, только если гликолитическое образование АТР подавлено арсенатом или фторидом. В условиях активного дыхания ни арсенат, ни фторид движения не тормозили [376, 1418]. Можно было полагать, что гликолитический АТР гидролизует Na^+ —АТРАЗой, которая образует $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, используемую затем Na^+ -мотором. Дальнейшее предположение состояло в том, что в аэробных условиях Na^+ —АТРАза действует как АТР-синтаза, образуя АТР за счет $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, генерируемой дыханием.

Как показали П. А. Дибров, М. Л. Верховская и Р. Л. Лазарова [33, 52, 466, 1417], добавление лактата к клеткам *V. alginolyticus*, отмытым от эндогенных субстратов, ведет к резкой стимуляции поглощения кислорода и многократному возрастанию уровня АТР, достигающего такового в неотмытых клетках. Этот синтез АТР стимулируется ионами Na^+ и подавляется HQNNO , ингибитором Na^+ -транспортирующей дыхательной цепи. Обратная $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ ($[\text{Na}^+]_{\text{внутр}} > [\text{Na}^+]_{\text{наруж}}$) полностью подавляет дыхательный синтез АТР без снижения скорости дыхания или величины $\Delta\psi$.

В дальнейших опытах нам удалось продемонстрировать синтез АТР, поддерживаемый энергией искусственно созданной $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ правильного направления ($[\text{Na}^+]_{\text{внутр}} < [\text{Na}^+]_{\text{наруж}}$). С этой целью 0,25 М NaCl добавляли к клеткам *V. alginolyticus*, инкубированным в безнатриевой среде. Было обнаружено, что NaCl вызывает быстрое повышение $[\text{АТР}]$. Через 1—2 мин после добавки NaCl уровень АТР вновь снижается до уровня, близкого к тому, что наблюдался до добавки. Последующее добавление лактата вызывало устойчивое повышение концентрации АТР (рис. 120, а).

Анализ эффектов NaCl и лактата выявил следующее: 1) действие NaCl , но не лактата снимается моненсином (см. рис. 120, а); 2) эффект лактата, но не NaCl блокируется посредством HQNNO

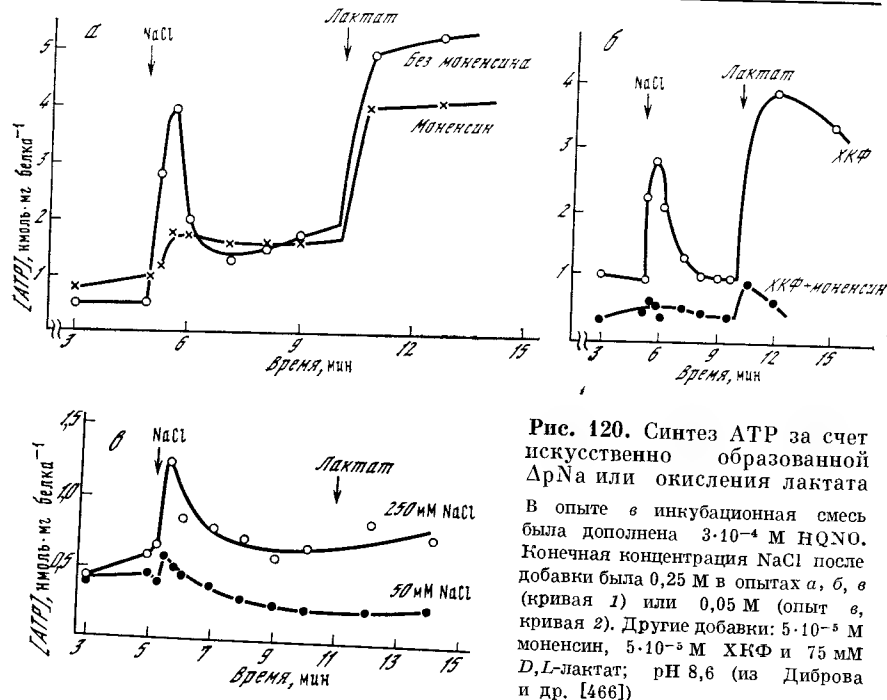


Рис. 120. Синтез АТФ за счет искусственно образованной $\Delta\mu\text{Na}$ или окисления лактата. В опыте в инкубационная смесь была дополнена $3 \cdot 10^{-4}$ М H_2QNO . Конечная концентрация NaCl после добавки была 0,25 М в опытах а, б, в (кривая 1) или 0,05 М (опыт в, кривая 2). Другие добавки: $5 \cdot 10^{-5}$ М моненсин, $5 \cdot 10^{-5}$ М ХКФ и 75 мМ D,L-лактат; pH 8,6 (из Диброва и др. [466])

(см. рис. 120, в); 3) протонофор ХКФ не снимает эффектов NaCl и лактата (см. рис. 120, б); 4) моненсин и ХКФ, добавленные совместно, почти полностью ингибируют действие как NaCl , так и лактата (рис. 120, б); 5) снижение концентрации добавленного NaCl с 0,25 М до 0,05 М резко снижает получаемый уровень АТФ (см. рис. 120, в), не влияя на фосфорилирование, поддерживаемое окислением лактата; 6) ни K^+ , ни Li^+ не заменяют Na^+ ; 7) синтез АТФ на добавку NaCl или лактата тормозится ДЦКД. Напомним, что ДЦКД служит ингибитором Na^+ -АТРАЗы *P. modestum* [472], H^+ -АТРАЗы (синтазы) и Ca^{2+} -АТРАЗы саркоплазматического ретикулула [1294]. Так же действует диэтилстильбэстрол, который, как известно, подавляет активность H^+ -АТРАЗ (синтаз) [1009] и некоторых контранспортных АТРАЗ животных [703] и бактерий, в частности, Na^+ -АТРАЗы *M. voltae* [903] и АТРАЗы микоплазмы [948].

Наблюдения, перечисленные выше, доказывают, что фосфорилирование, вызванное NaCl и лактатом, катализируется Na^+ -АТР-синтазой, чувствительной к ДЦКД и диэтилстильбэстролю (рис. 121). В данном контексте уместно отметить два факта, упомянутые выше, а именно что животная Na^+/K^+ -АТРаза, очень специфичная к Na^+ , тем не менее хорошо связывает и переносит через мембрану ионы H^+ [676], а Na^+ -АТРаза *P. modestum* на-

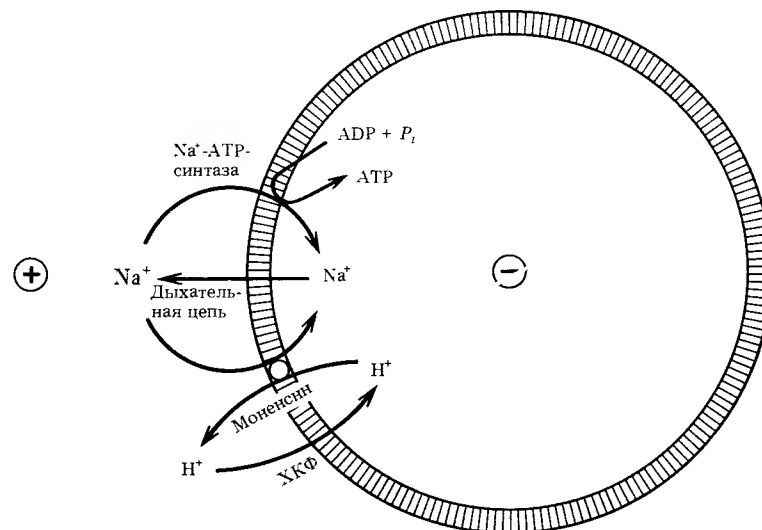


Рис. 121. Механизм действия моненсина и ХКФ на Na^+ -зависимое окислительное фосфорилирование

Дыхательная цепь откачивает из клетки ионы Na^+ , генерируя $\Delta\psi$ и $\Delta\mu\text{Na}$ (цитоплазма заряжается отрицательно, $[\text{Na}]_{\text{внутри}} < [\text{Na}]_{\text{наружу}}$). Na^+ возвращается в клетку через Na^+ -АТР-синтазу, образуя АТР. Моненсин вызывает обмен $\text{Na}^+_{\text{наружу}}/\text{H}^+_{\text{внутри}}$, превращая $\Delta\mu\text{Na}$ в $\Delta\mu\text{H}$. Это происходит без больших последствий для дыхательного фосфорилирования, поскольку снижение $\Delta\mu\text{Na}$ компенсируется повышением $\Delta\psi$ благодаря электрогенности экспорта Na^+ дыхательной цепью. При этом моненсин блокирует образование АТР, вызванное добавкой NaCl , так как в данном случае вся $\Delta\mu\text{Na}$ представлена $\Delta\mu\text{H}$. ХКФ, добавленный без моненсина, слабо влияет на дыхательный синтез АТР, поскольку снижение $\Delta\psi$ из-за электрофоретического входа H^+ в клетку восполняется ростом $\Delta\mu\text{Na}$. В случае искусственной $\Delta\mu\text{Na}$ электрический компонент просто отсутствует. В то же время совместное добавление ХКФ и моненсина, снимающих соответственно $\Delta\psi$ и $\Delta\mu\text{Na}$, подавляет Na^+ -зависимый синтез АТР, подобно тому как комбинация ваиномицина и нигерицина угнетает H^+ -зависимое фосфорилирование

поминает по структуре H^+ -АТР-синтазу [471] и даже транспортирует H^+ , если в среде нет Na^+ . Эти факты в сочетании с данными ингибиторного анализа могут свидетельствовать об определенной общности механизмов протонных и натриевых АТРАЗ (АТР-синтаз). Подобную общность можно себе представить, например, если протоны, транспортируемые через фактор F_0 , не идентичны тем, которые потребляются в каталитическом центре фактора F_1 , а сопряжение транспорта H^+ и синтеза АТР осуществляется путем конформационного изменения фермента (см. выше рис. 77, б).

Итак, в клетках *V. alginolyticus* натриевый потенциал, образованный дыханием, может использоваться для синтеза АТР. Этот факт завершает систему экспериментального доказательства концепции Na^+ -цикла, предполагающего, что Na^+ может использо-

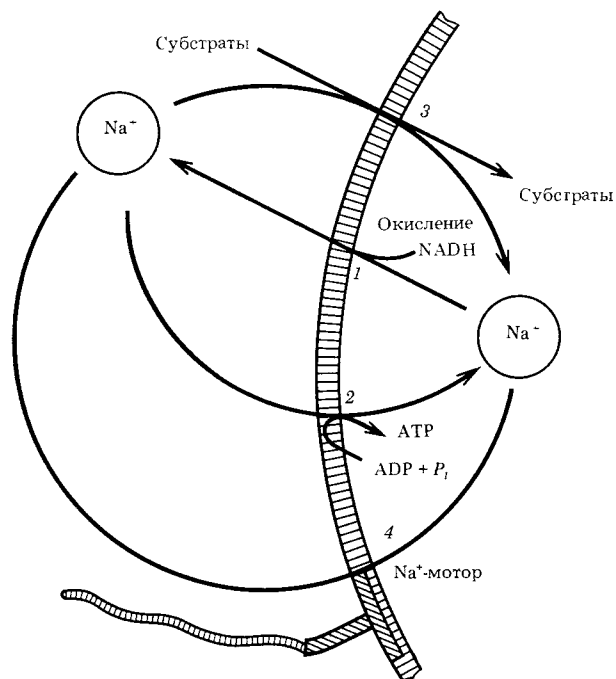


Рис. 122. Натриевый цикл в клетке *Vibrio alginolyticus*

$\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ генерируется Na^+ -транспортирующей NADH-хинонредуктазой и используется для химической работы [синтеза АТФ Na^+ -АТФ-синтазой (2)], осмотической работы [симпорта Na^+ и метаболитов (3)] и механической работы [вращения флагаеллы Na^+ -мотором (4)] [131]

ваться вместо H^+ в качестве иона, сопрягающего экзергонические процессы с совершением всех трех основных типов работы: химической, осмотической и механической (рис. 122) [131, 455, 613, 1416, 1420]. *V. alginolyticus* оказался первым представителем живых существ, располагающих полным Na^+ -циклом.

7.3. Как часто используется Na^+ -цикл живыми клетками?

Рис. 123 иллюстрирует тот факт, что $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ обычного направления может эффективно использоваться только при кислых или нейтральных значениях рН внешней среды.

В этих условиях откачка протонов из цитоплазмы поддерживает $\Delta\bar{\Psi}$ и ΔpH «правильного» знака, т. е. благоприятного для входа H^+ обратно в клетку.

При щелочных рН тот же процесс генерирует «правильную» $\Delta\bar{\Psi}$ на фоне обратной ΔpH . Дело в том, что концентрация ионов H^+ в клетке алкалофилов должна поддерживаться на более высоком

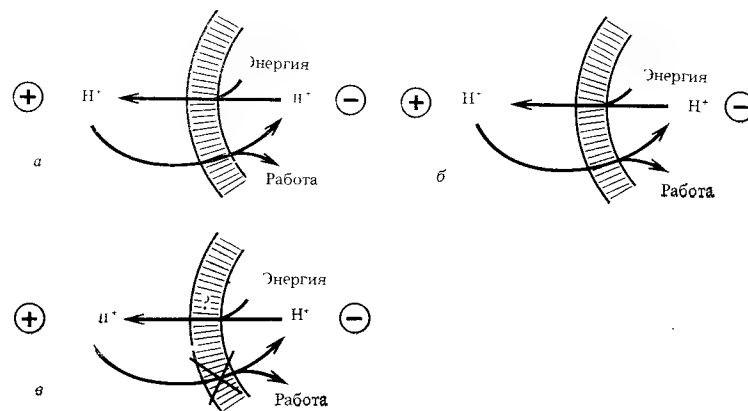
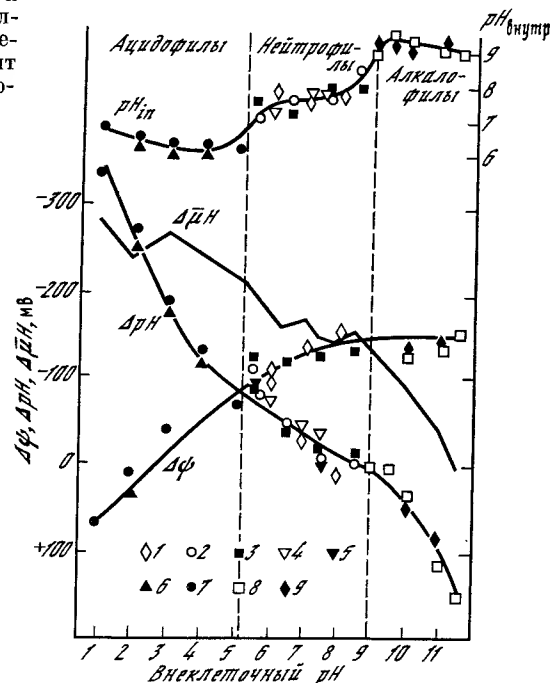


Рис. 123. Эффективное использование $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ ацидо- и нейтрофилами, но не алкалофилами, где электрический градиент H^+ направлены в противоположные стороны

а — ацидофилы, $\Delta\bar{\mu}\text{H} \approx -Z\Delta\text{pH}$; б — нейтрофилы, $\Delta\bar{\mu}\text{H} = \Delta\bar{\Psi} - Z\Delta\text{pH}$; в — алкалофилы, $\Delta\bar{\mu}\text{H} \approx 0$

Рис. 124. $\text{pH}_{\text{внутр}}$, $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, ΔpH и $\Delta\bar{\Psi}$ как функции от $\text{pH}_{\text{наруж}}$ для различных видов бактерий

- 1 — *Escherichia coli*,
- 2 — *Micrococcus lysodeikticus*,
- 3 — *Halobacterium halobium*,
- 4 — *Streptococcus faecalis*,
- 5 — *Bacillus subtilis*,
- 6 — *Bacillus acidocaldarius*,
- 7 — *Thiobacillus ferrooxidans*,
- 8 — *Bacillus alkalophilus*,
- 9 — *Bacillus firmus* (по: Падан и соавт [1157]).



уровне, чем снаружи, чтобы избежать щелочной инактивации внутриклеточных ферментов.

В результате ион H^+ , откаченный из цитоплазмы, не может произвести полезной работы, так как, возвращаясь назад в клетку, он движется по $\Delta\bar{\Psi}$, но против ΔpH . Замена сопрягающего

иона (H^+ на Na^+) может решить проблему, как это оказалось в случае *V.alginolyticus*. Другие алкалотолерантные и алкалофильные бактерии также, по-видимому, энергизуют свою цитоплазматическую мембрану без участия протонного потенциала, по крайней мере в его обычной форме, делокализованной по всей мембране. Такое заключение следует из данных, представленных на рис. 124, где наглядно выявляется стратегия трех различных типов бактерий в стремлении поддержать постоянный $pH_{внутр}$ при различных $pH_{наруж}$. Прежде всего — это сведение к минимуму величины ΔpH . Так, ацидофилы имеют $pH_{внутр}$ около 6, нейтрофилы — 7,5; а алкалофилы — 9. Менее универсальна другая тенденция — повышать $\Delta\psi$ по мере снижения ΔpH , чтобы избежать снижения $\Delta\bar{\mu}H$ при уменьшении концентрации водородных ионов во внешней среде. Это влияние наблюдается только у ацидо- и нейтрофилов, т. е. у бактерий, живущих при $pH_{наруж} < 9$.

В более щелочных средах происходит катастрофическое падение $\Delta\bar{\mu}H$, поскольку ΔpH снижается до отрицательных величин ($[pH_{внутр}] < [pH_{наруж}]$), а рост $\Delta\psi$ прекращается. В результате величина $\Delta\bar{\mu}H$ становится близкой к нулю. Вот почему у *V.alginolyticus* $\Delta\bar{\mu}H$ заменен на $\Delta\bar{\mu}Na$.

В то же время подобная замена имеет место также у некоторых нейтрофилов. Таковы анаэробы, а также *Salmonella typhimurium*, использующие Na^+ -транспортирующие декарбоксилазы. Например, *P. modestum* растет при pH 6,5—8,4 с оптимумом между 7,1 и 7,7 [1317].

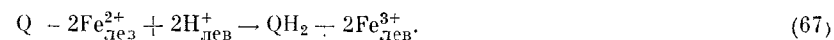
Мутант *S. faecalis*, лишенный H^+ —АТФазы, а также дикий штамм того же микроба, выращенный в присутствии протонофора, могут служить примерами, когда развитие натриевой энергетики не связано с жизнью в щелочной среде. (Как отмечалось в разделе 7.1.3, в обоих упомянутых случаях происходит индукция Na^+ —АТФазы.)

Интересно, что отдельные компоненты Na^+ -цикла можно найти у такого нейтрофила, как *E. coli*, которая накапливает определенные метаболиты в симпорте с Na^+ . Этот способ совершения осмотической работы является основным для многих морских и галофильных бактерий, а также для внешней мембраны животных клеток (раздел 7.2.1). Здесь также очевидно, что использование натриевой энергетики обусловлено иными причинами, чем приспособление к щелочным условиям среды.

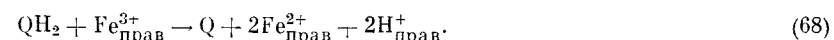
7.4. Возможные эволюционные отношения между протонным и натриевым миром

Можно предположить, что эволюционно первичным сопрягающим ионом был H^+ . Нетрудно представить себе, как примитивная живая клетка могла бы изобрести $\Delta\bar{\mu}H$ -генератор, устроенный по типу редокс-петли Митчела [1043, 1046]. Механизм редокс-петли

предполагает, что некий акцептор *атомов водорода*, скажем, хинон Q, восстанавливается донором *электронов*, например цитохромом Fe^{2+} . Если такой процесс протекает вблизи одной из поверхностей мембраны (допустим, левой), ионы водорода должны поглощаться из воды, омывающей эту поверхность:



Образованный QH_2 диффундирует в сторону своей меньшей концентрации к противоположной стороне мембраны и там окисляется акцептором *электронов*, например, другим цитохромом Fe^{3+} . В результате ионы *водорода* освобождаются в воду справа от мембраны:



Эти две реакции и диффузия QH_2 образуют «полупетлю», переносящую атомы водорода. Другая «полупетля» представляет собой перенос электронов через мембрану, направленный справа налево.

Тот факт, что редокс-петля образует разность электрохимических потенциалов ионов *водорода*, есть прямое и неизбежное следствие химизма окислительной реакции, поставляющей энергию. Схема редокс-петли была прямо доказана для фотосинтетических редокс-центров пурпурных бактерий (раздел 3.1.2). Есть ряд свидетельств, что она верна также для фотосистем I и II хлоропластов и цианобактерий (раздел 3.3.1). Редокс-циклы, включенные, по-видимому, в механизмы генерации $\Delta\bar{\mu}H$ дыхательной цепью, можно рассматривать как усложненный вариант редокс-петли (раздел 3.4.6).

В то же время существуют $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы, использующие энергию без участия системы H/e^- -антипорта. Таковы, в частности, трансгидрогеназа (раздел 5.1.3) и бактериородопсин (раздел 3.5.1). В этих случаях поставляющий энергию процесс сопряжен с генерацией $\Delta\bar{\mu}H$ не прямо, как в редокс-петле, а каким-то иным, более изощренным способом. Системы такого типа уже не предполагают с неизбежностью участие H^+ в качестве сопрягающего иона. Поэтому неудивительно, что не прямые механизмы сопряжения используются для транспорта других ионов. Так, бактериородопсин переносит H^+ , а близкий к нему по пространственной и первичной структуре галородопсин транспортирует Cl^- (раздел 3.5.8.1).

Генераторы натриевого потенциала с очевидностью попадают в разряд не прямых преобразователей энергии и потому могут рассматриваться как эволюционно более поздние изобретения.

В тех случаях, когда поглощение и выделение ионов H^+ уже не есть следствие химизма процесса, замена H^+ на Na^+ имеет известные преимущества.

1. Как уже обсуждалось, это сообщает клетке устойчивость к средам с низкой $[H^+]$.

2. Проводимость липидной мембраны для H^+ по крайней мере в 10^6 раз выше, чем для Na^+ [663]. Эта величина должна быть еще большей, если липидный бислой содержит включения белков, располагающих протонакцепторными группами, которые могут облегчить эстафетный механизм H^+ -проводимости. В то же время $[H^+]$ в среде обычно в $\sim 10^6$ раз ниже, чем $[Na^+]$. Соотношение этих двух параметров может приводить к тому, что клетке оказывается легче удерживать градиент Na^+ , чем H^+ . По-видимому, названное соотношение становится неблагоприятным для Na^+ -энергетики только у экстремальных галофилов, живущих в насыщенном растворе NaCl. Быть может, именно по этой причине они используют H^+ , а не Na^+ в качестве первичного сопрягающего иона, несмотря на высокую $[Na^+]_{\text{наруж}}$.

3. Последний и, может быть, самый важный момент состоит в том, что внутриклеточные ферменты гораздо чувствительней к изменению концентрации H^+ , чем Na^+ , особенно если, скажем, снижение $[Na^+]_{\text{внутр}}$ компенсируется повышением $[K^+]_{\text{внутр}}$. Поэтому клетка, откачивающая из цитоплазмы Na^+ , выглядит биологически более совершенной, чем та, которая откачивает H^+ . В такой клетке $pH_{\text{внутр}}$ становится независимым от скорости мембранных процессов преобразования энергии, и, наоборот, эти процессы выводятся из-под контроля со стороны цитоплазматического рН.

Следуя подобной логике, можно понять, почему такая эволюционно молодая мембрана наиболее прогрессивного царства живых существ, как плазмалемма животной клетки, использует Na^+ в качестве сопрягающего иона. Что же касается H^+ , то в животной клетке ему отводится роль одного из внутриклеточных посредников регуляторных сигналов, поступающих в клетку извне (см. ниже раздел 7.5).

Как уже отмечалось, с одной стороны, слишком высокая $[Na^+]_{\text{наруж}}$ может оказаться неблагоприятной для натриевой энергетики. С другой стороны, $[Na^+]_{\text{наруж}}$ не должна быть и слишком низкой, иначе не удастся создать Na^+ -градиент нужного направления, т. е. $[Na^+]_{\text{внутр}} < [Na^+]_{\text{наруж}}$. Это требование выполняется для клеток животных и для микроорганизмов, за исключением пресноводных. Заметим, что *V. alginolyticus* и *P. modestum*, служащие в настоящее время наиболее яркими примерами натриевой энергетики, выделены из моря.

Чтобы выявить таксономические связи между живыми существами, использующими H^+ или Na^+ в качестве сопрягающих ионов, К. М. Чумаков в нашей лаборатории построил дендрограмму, основанную на анализе нуклеотидных последовательностей рибосомальных 5S-РНК [11, 207, 379]. Эти РНК очень консервативны и распространены среди всех современных форм жизни. Они не-

лики по длине, что облегчает определение их первичной структуры.

Дендрограмма показана на рис. 125. Длина отрезков на ней пропорциональна числу мутаций, которым в разных положениях нуклеотидной последовательности придан различный «вес», тем больший, чем реже встречается данная мутация. Это сделано для того, чтобы учесть объем «эволюционной работы» для каждой мутации.

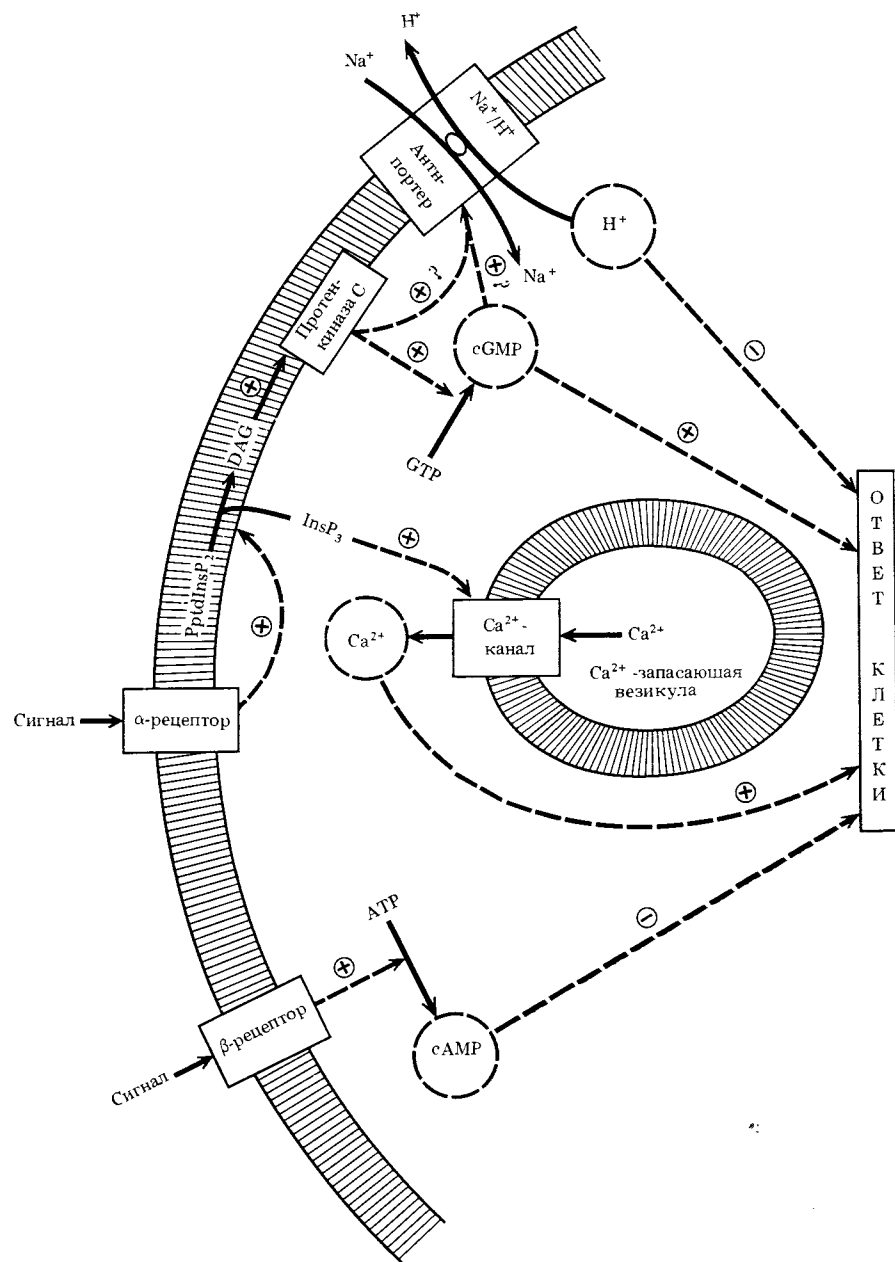
Следует отметить, что дендрограмма не дает представления о направлении эволюционного процесса. Она только отвечает на вопрос, насколько близки между собой рассматриваемые микробы по анализируемому параметру. Поэтому нельзя сказать, где находится корень родословного дерева бактериального царства. Такой способ свободен от бездоказательного допущения о том, что скорость эволюционного процесса всегда была постоянной.

Распределение на дендрограмме родов, использующих $\Delta\bar{p}Na$ (I), указывает, что Na^+ -цикл был открыт бактериями достаточно давно. Розен [1269] даже предположил, что натриевая энергетика появилась до протонной, которая пришла на смену Na^+ -циклу, когда бактерии поднялись из моря в реки, т. е. перешли из соленой воды в пресную с ее низкой $[Na^+]$. Эту гипотезу трудно исключить, как и многие другие построения эволюционистов. Однако соображения, изложенные в начале настоящего раздела, делают, как нам кажется, более вероятной альтернативную точку зрения, т. е., что первичным сопрягающим ионом был H^+ .

Приняв, что сначала была протонная энергетика, можно представить себе возможный путь становления натриевого цикла. Первым этапом могло быть использование градиентов Na^+ и K^+ как $\Delta\bar{p}H$ -буферов (см. раздел 6.3.1).

Следующей стадией эволюции стало, по-видимому, прямое использование $\Delta\bar{p}Na$, образованной совместным действием $\Delta\bar{p}H$ -генератора и Na^+/H^+ -антипортера, для совершения осмотической работы Na^+ , метаболит-симпортерами. Создание Na^+ -цикла завершилось с появлением первичных $\Delta\bar{p}Na$ -генераторов, не требующих $\Delta\bar{p}H$ для образования натриевого потенциала. Большинство этих событий произошло, по-видимому, на достаточно ранних этапах эволюции жизни, так что теперь отдельные компоненты Na^+ -цикла обнаруживаются в самых различных таксонах: *Vibrio*, *Propionigenum*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, метанообразующие бактерии, цианобактерии (а также, по всей вероятности, *Pseudomonas*, *Mycoplasma*) и, наконец, животные клетки. Возможно, даже «классическая» *E. coli* имеет представителей натриевого мира среди своих далеких предков, иначе трудно понять, почему эта бактерия накапливает некоторые метаболиты за счет $\Delta\bar{p}Na$.

Недавно Джонс и Бичи [787] исследовали мутанта *E. coli*, устойчивого к разобщителям и способного расти на минимальной



рецептором [957]. Гидролиз PtdInsP_2 приводит к освобождению в цитозоль инозиттрифосфата (InsP_3), в то время как другой продукт гидролиза — диацилглицерид (DAG) остается в мембране. InsP_3 диффундирует по цитозолю к внутриклеточным пузырькам, накапливающим Ca^{2+} (в мышцах — саркоплазматический ретикулум), и открывает кальциевые каналы в их мембране. Ионы Ca^{2+} освобождаются в цитозоль и запускает цепь дальнейших событий, приводящую к клеточному ответу, причем эффект ионов Ca^{2+} обычно опосредован кальмодулином. В частности, вышедший Ca^{2+} может быть поглощен митохондриями [256], где он активировать такие ключевые дыхательные ферменты, как пируват-изоцитрат- (NAD^+) дегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа [1007].

Что касается DAG, также образующегося при гидролизе PtdInsP_2 , он либо расщепляется до глицерина и двух жирных кислот, одна из которых (арахидоновая) — предшественник простагландинов, либо диффундирует в плоскости мембраны, пока не находит своей мишени — протеинкиназы C. В отсутствие DAG прочность связи этого фермента с мембраной сравнительно слаба, а для его активации требуется относительно большая концентрация Ca^{2+} . DAG резко увеличивает сродство фермента к Ca^{2+} и упрочивает его связь с мембраной. В результате фермент активируется и начинает фосфорилировать определенные белки, среди которых гуанилатциклаза. Фосфорилирование последней ведет к ее активации и, следовательно, повышает уровень cGMP в цитозоле [1388].

Протеинкиназа C через cGMP или более прямо активирует Na^+/H^+ -антипортёр во внешней клеточной мембране. Поскольку $\text{Na}^+ \text{ K}^+ \text{--ATPase}$ поддерживает низкую концентрацию Na^+ внутри клетки, Na^+ начинает поступать в цитозоль в обмен на ион H^+ . В результате pH цитозоля сдвигается в щелочную сторону [250, 1112].

Есть ряд свидетельств, что снижение концентрации H^+ внутри клетки стимулирует ее активность так же, как повышение концентрации Ca^{2+} [250, 712]. Другими словами, H^+ можно рассматривать как антагонист ионов Ca^{2+} и синергист cAMP, часто тормозящий активность клетки (уровень cAMP повышается при стимуляции β -рецепторов — см. рис. 126).

Активность любого фермента характеризуется определенным оптимумом pH. Можно предположить, что pH-оптимумы ключевых ферментов метаболизма, существенных для клеточного отве-

Рис. 126. Механизм передачи внеклеточных сигналов внутрь клетки

Регуляторные эффекты отмечены пунктирными линиями, 1 и 2 означают активацию и торможение. Четыре главных внутриклеточных посредника (H^+ , Ca^{2+} , cAMP и cGMP) выделены пунктирными кружками. PtdInsP_2 — фосфатидинозитидфосфат, InsP_3 — инозит-1,4,5-трифосфат, DAG — диацилглицерид. Роль сигналов выполняют молекулы гормонов, нейротрансмиттеров, ростовых факторов и т. д. В случае катехоламинов действуют рецепторы α - и β -типов

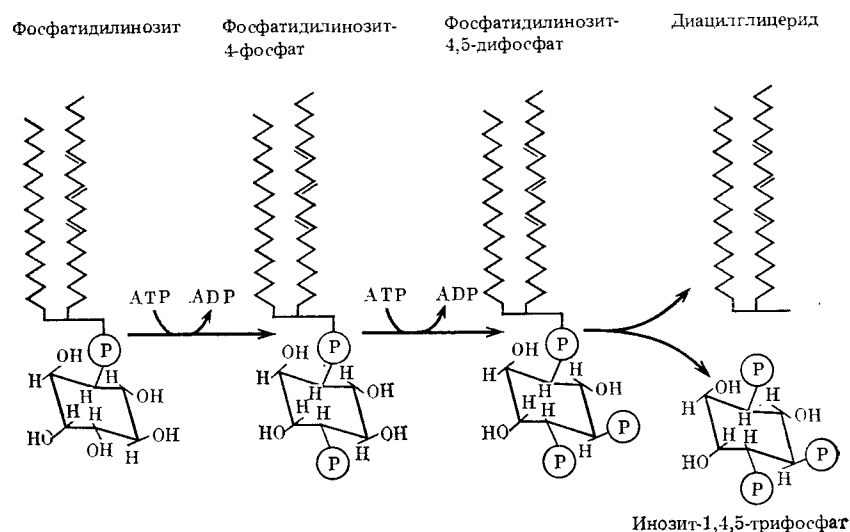


Рис. 127. Образование инозиттрифосфата и диацилглицерид из фосфатидинозита

та, включаемого подщелачиванием цитоплазмы, сдвинуты, скажем, в сторону более щелочных рН. Если это было бы так, то само по себе повышение цитоплазматического рН стимулировало бы ответ клетки. Более совершенная система контроля могла бы включить протеинкиназу, имеющую оптимум при щелочном рН, которая атакует ключевые ферменты, участвующие в клеточном ответе. Еще одна возможность состоит в том, что снижение $[H^+]$ в цитозоле повышает каким-то образом цитоплазматический уровень Ca^{2+} . Иными словами, эффект рН реализуется через Ca^{2+} (см., например, [649]).

Пример регуляции по одному из перечисленных выше механизмов был описан недавно Хескетом и соавт. [712], показавшими, что подщелачивание цитоплазмы, подобно повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+} , имеет следствием митогенную стимуляцию эукариотических клеток. Аналогичный эффект наблюдали также Пуисегю и соавт. [1201—1203], показавшие, что сдвиг внутриклеточного рН от 7,2 всего лишь до 7,4 активирует процесс синтеза ДНК от нуля до максимальной скорости. В опытах использовали фибробласты, к которым были добавлены тромбин и инсулин в качестве стимуляторов клеточного деления.

Складывается впечатление, что существуют две системы метаболизма: одна, требующая чуть более кислого рН, а другая — чуть более щелочного. Переключение с одной системы на другую могло бы достигаться активацией или ингибированием Na^+ , H^+ -антитранспортера во внешней клеточной мембране.

Ион водорода — простейший ингредиент цитозоля. Он может связываться с функциональными группами многих белков. Поэтому не составляет проблемы организовать в ферменте регуляторный центр обратимого связывания ионов H^+ . Диффузия H^+ , ускоренная рН-буферами цитозоля, может происходить чрезвычайно быстро. Все это делает ион водорода хорошим кандидатом на роль внутриклеточного посредника регуляторных сигналов. Будущие исследования призваны показать, в какой мере клетка использует H^+ в подобных целях ².

7.6. Общая схема соотношений протонного и натриевого циклов

Превращения энергии в мембранах, сопряженные посредством образования и использования ионных потенциалов, суммированы на рис. 128. Предполагается, что роль сопрягающих ионов исполняют H^+ (черные стрелки) или Na^+ (белые стрелки).

Простые протонные схемы *a* и *б* (см. рис. 128) описывают трансформацию энергии в мембранах, специализированных на выполнении одного типа $\Delta\bar{p}H$ -зависимой работы — химической или осмотической. Схема *a* (см. рис. 128) реализуется в мембранах бактериальных хромофоров и тилакоидах хлоропластов. В обоих случаях энергия света используется для образования протонного потенциала $\Delta\bar{p}H$ -генераторами фотосинтетической редокс-цепи. Образованный $\Delta\bar{p}H$ потребляется H^+ —АТФ-синтазой (в хромофоре *Rh. rubrum* — также и H^+ — PP_i -синтазой).

Другой пример монофункциональной протонной мембраны приведен на рис. 128, *б*. Здесь $\Delta\bar{p}H$, создаваемая $\Delta\bar{p}H$ -генератором, используется для концентрирования определенных соединений (осмотическая работа). У прокариот примером подобной системы могут быть анаэробные бактерии, образующие АТФ посредством субстратного фосфорилирования (например, гликолиза). У эукариот та же схема применима к внешней клеточной мембране и тонопласту растений и грибов, а также к мембранам лизосом и секреторных гранул некоторых животных клеток (например, хромофинных гранул). В этих случаях роль $\Delta\bar{p}H$ -генератора играет H^+ —АТРаза, а роль потребителей $\Delta\bar{p}H$ — H^+ , метаболит-симпортеры.

Гораздо более сложная схема описывает энергетику цитоплазматической мембраны многих аэробных и фотосинтезирующих бактерий (см. рис. 128, *в*). Здесь химическая работа (синтез АТФ), осмотическая работа (накопление веществ) и механическая работа

² Регуляторные ответы клетки на изменение цитоплазматического рН присущи не только животным. По Гёрингу, закисление цитоплазмы — необходимый этап клеточного ответа на гормоны ауксин и фузикоцин, вызывающие удлинение клеток растений ([630, 631], см. также [318, 320, 321]).

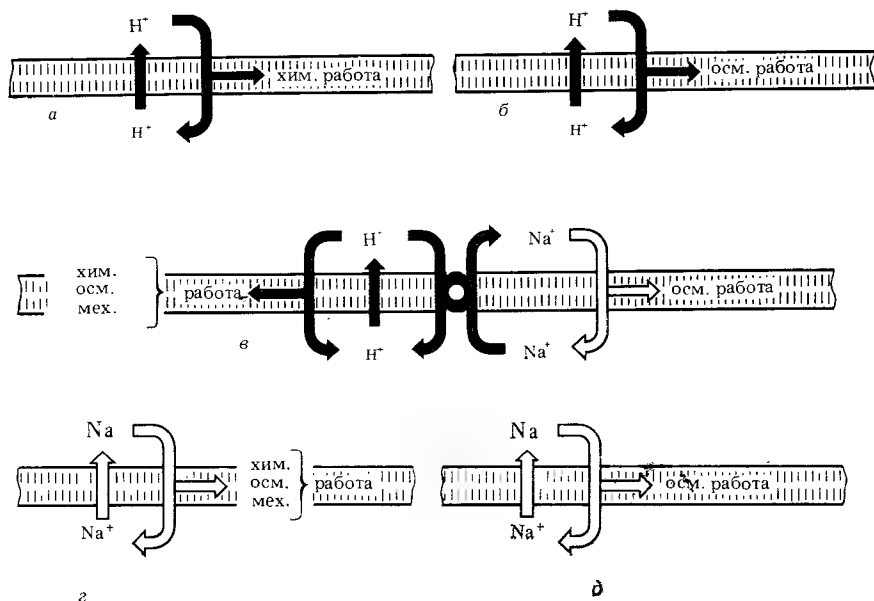


Рис. 128. Пять типов мембранных систем превращения энергии $\Delta\bar{\mu}H$ или $\Delta\bar{\mu}Na$

Черные стрелки обозначают протонную энергетику, а белые — натриевую. Химическая (хим.) работа: синтез АТФ и PP_i и обратный перенос восстановительных эквивалентов. Осмотическая (осм.) работа: перенос веществ против их концентрационных градиентов. Механическая (мех.) работа: движение посредством H^+ - или Na^+ -моторов [1417]

(вращение ротора H^+ -мотора) осуществляются за счет $\Delta\bar{\mu}H$, которая образуется дыхательными или фотосинтетическими $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторами. Кроме того, $\Delta\bar{\mu}H$ используется Na^+/H^+ -антипортером для получения $\Delta\bar{\mu}Na$, играющей роль $\Delta\bar{\mu}H$ -буфера. $\Delta\bar{\mu}Na$ может использоваться также для совершения осмотической работы Na^+ , метаболит-симпортерами. Последний процесс является, по существу, одной из составных частей натриевого цикла.

Фактором, благоприятным для совершения работы, сопряженной со входом в клетку ионов Na^+ , является превышение концентрации Na^+ снаружи над концентрацией внутри цитоплазмы. Это требование не выполняется для пресноводных микроорганизмов. Здесь реализуется упрощенный вариант схемы в (см. рис. 128), где ионы Na^+ не фигурируют. Подобная логика применима и к митохондриям, поскольку внешней средой для них служит цитозоль, содержащий, как правило, мало ионов Na^+ . Действительно, ни Na^+/H^+ -антипорт, ни Na^+ , метаболит-симпорт не характерны для митохондрий.

Натриевый цикл показан на схеме г (см. рис. 128). В своем полном выражении схема Na^+ -цикла требует, чтобы все три типа мембранной работы поддерживались натриевым потенциалом, образующим первичным $\Delta\bar{\mu}Na$ -генератором. *Vibrio alginolyticus*, растущий при щелочном pH, оказался первым примером, где был экспериментально доказан полный Na^+ -цикл.

Упрощенный вариант натриевого цикла показан на рис. 128, д. Фактически он аналогичен схеме б (см. рис. 128) с единственной разницей, что функции H^+ выполняет Na^+ . Здесь АТФ также используется в качестве источника энергии, но мембрана энергизуется АТФазой, транспортирующей Na^+ , а не H^+ —АТФазой. Плазматическая мембрана животной клетки служит наиболее разрабатанной системой такого типа. Здесь $\Delta\bar{\mu}Na$ генерируется Na^+/K^+ —АТФазой (или Na^+ —АТФазой) и потребляется главным образом Na^+ , метаболит-симпортерами. Фактически именно внешняя клеточная мембрана животных оказалась хронологически первой в ряду систем, где был описан Na^+ -цикл. Долгое время казалось, что подобный принцип есть одно из эволюционных достижений животной клетки. Однако теперь уже ясно, что натриевая энергетика была открыта прокариотами и лишь затем, по всей вероятности, унаследована от них животными, причем в упрощенном варианте.

Можно полагать, что схема д (см. рис. 128) присуща также анаэробным бактериям, утилизирующим гликолитический АТФ в условиях, когда не работает протонный цикл. Таков, вероятно, *Streptococcus faecalis*, лишенный H^+ —АТФазы или растущий в присутствии разобщителя.

Список процессов образования и использования $\Delta\bar{\mu}Na$ у разных организмов (табл. 17) свидетельствует о том, что сейчас примеры натриевой энергетики далеко не столь многочисленны, как случаи, когда используется протонный цикл. Однако мы должны здесь иметь в виду, что открытие роли Na^+ как сопрягающего иона, способного выполнять все биоэнергетические функции протона, произошло совсем недавно. Огромное таксономическое разнообразие организмов, использующих натриевый цикл, от вибрионов, анаэробных бактерий, кокков до цианобактерий и, наконец, животных указывает на всеобщий характер распространения этого нового типа мембранной биоэнергетики.

Будущим исследованиям предстоит выяснить действительные масштабы натриевого мира. Но уже и сейчас ясно, что это достаточно обширная область биосферы.

В поисках представителей натриевого мира следует учитывать то обстоятельство, что H^+ - и Na^+ -циклы могут сосуществовать в одном и том же объекте, причем переключение с H^+ на Na^+ и наоборот может регулироваться условиями внешней среды. Выше мы уже упомянули об индукции Na^+ —АТФазы у *S. faecalis*. У *V. alginolyticus* натриевая энергетика, видимо, сменяется

Таблица 17. Пути образования и использования $\Delta\bar{\mu}H$

Процесс	Вид	Литератур- ный источник
А. Образование $\Delta\bar{\mu}Na$		
Na^+ _{внутр} / H^+ _{наруж} -анти-порт	Многие бактерии	[886]
Окисление NADH мена(уби)хиноном	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio costicola</i> , галотолерантная бактерия <i>B₁</i>	[832, 1512, 1533]
Декарбоксилирование оксалоацетата	<i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	[326, 467, 471, 475]
Декарбоксилирование глутаконил-CoA	<i>Acidaminococcus fermentans</i> , <i>Clostridium symbiosum</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	[326–328, 1612]
Декарбоксилирование метилмалонил-CoA	<i>Propionigenum modestum</i> , <i>Veilonella alcalensis</i>	[722]
Гидролиз ATP	<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Propionigenum modestum</i> , животные (внешняя клеточная мембрана)	[702] [722] [1215, 1216, 1391, 1392]
Б. Утилизация $\Delta\bar{\mu}Na$		
Na^+ _{наруж} / H^+ _{внутр} -анти-порт	Многие бактерии; животные (внешняя клеточная мембрана)	[54]
Na^+ , метаболит-симпорт	Многие бактерии; животные (внешняя клеточная мембрана)	[518, 886]
Синтез ATP	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Propionigenum modestum</i> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> *	[466] [722] [155, 1335]
Вращение флагеллы	<i>Methanococcus voltae</i> * <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Bacillus firmus</i> * Алкалофильная <i>Bacillus YN-1</i> * <i>Oscillatoria brevis</i> *	[155, 411, 903] [466] [853] [729] [311]

* Способ образования $\Delta\bar{\mu}Na$ остается неизвестным.

протонной при увеличении $[H^+]_{\text{наруж}}$ [1512]. Субклеточные частицы *V. costicola* окисляют NADH и лактат соответственно Na^+ - и H^+ -транспортирующими дыхательными цепями [1533]. В опытах с *Methanococcus voltae* было найдено, что синтез ATP удается включить искусственно созданными градиентами как ионов Na^+ , так и ионов H^+ [411].

Вероятно, в определенных случаях Na^+ - и H^+ -циклы могут объединяться в единую систему энергетического сопряжения. Недавние опыты Димрота показали, что *Klebsiella aerogenes* образует $\Delta\bar{\mu}Na$ за счет Na^+ -транспортирующей декарбоксилазы, затем превращает $\Delta\bar{\mu}Na$ в $\Delta\bar{\mu}H$ посредством Na^+/H^+ -антипортера и, наконец, использует эту $\Delta\bar{\mu}H$ для синтеза ATP [471].

7.7. Превращения энергии в биомембранах без участия H^+ и Na^+

Рассматривая соотношение протонного и натриевого миров, уместно задаться вопросом, нет ли также еще одного (третьего) мира, где ни H^+ , ни Na^+ не участвуют в энергетическом сопряжении. В настоящее время ответ на этот вопрос однозначен и отрицателен.

Сказанное не означает, что среди всего многообразия процессов превращения энергии в мембранах нельзя найти таких, которые обходятся без H^+ и Na^+ . Однако все это — исключительные случаи, не складывающиеся в единую энергетическую систему, подобную протонной или натриевой энергетике.

Рассмотрим к примеру биоэнергетические функции ионов K^+ . Как уже отмечалось в разделе 6.3.1, у бактерий ΔpK может возникать за счет $\Delta\psi$ -составляющей протонного (или натриевого) потенциала, образуемого $\Delta\bar{\mu}H$ (или $\Delta\bar{\mu}Na$)-генераторами. Если *E. coli* растет в среде с очень низким содержанием K^+ , то индуцируется K^+ —АТРаза E_1E_2 -типа (система *Kdp*), аккумулирующая в клетке ионы K^+ за счет энергии ATP [541, 714]. Функции образуемой ΔpK ограничены стабилизацией $\Delta\psi$ и осмотического давления.

В животных тканях K^+ -градиент, как правило, образуется Na^+/K^+ —АТРазой. Роль иона K^+ в этом случае сводится к функции противоиона для иона Na^+ , который откачивается из клетки с целью образования $\Delta\bar{\mu}Na$ — «конвертируемой валюты» внешней мембраны животной клетки.

В разделе 4.5.3. мы рассмотрели K^+/H^+ —АТразу эпителия слизистой желудка высших животных. Здесь K^+ служит противоионом для H^+ , откачиваемого из клетки для подкисления желудочного сока.

В эпителии некоторых насекомых электрогенная K^+ —АТРаза катализирует транспорт массовых количеств K^+ от базальной к апикальной стороне эпителиальной клетки. Этот процесс важен для движения жидкости через эпителий. В отличие от Na^+/K^+ —АТРАЗЫ и K^+/H^+ —АТРАЗЫ, K^+ —АТРаза насекомых откачивает K^+ из клетки. Она локализована в апикальной области плазматической мембраны. K^+ —АТРаза образует грибовидные выросты размером около 10 нм, внешне напоминающие фактор F_1 [483,

688, 689]. Активность устойчива к оубаину и специфически тормозится инсектицидом дельтаэндотоксином из *Bacillus thuringiensis* [483, 688].

В эпителии кишечника одного из червей K^+ —АТРаза откачивает K^+ из клетки, создавая $\Delta\psi$, которая используется для удаления ионов H^+ из просвета кишечника. В результате рН в кишечнике поддерживается на уровне 10—11. $\Delta\mu K$ или одна из ее составляющих, по-видимому, служит движущей силой аккумуляции аминокислот в клетках эпителия посредством K^+ , аминокислота-симпортера [483, 609].

В мембране эндоплазматического ретикулума и внешней клеточной мембране животных (а также в цитоплазматической мембране бактерий) имеется Ca^{2+} —АТРаза E_1E_2 -типа, которая переносит Ca^{2+} из цитозоля в просвет ретикулума или в межклеточник. Нет никаких свидетельств тому, что образуемая $\Delta\mu Ca$ может использоваться для совершения полезной работы. По всей вероятности, единственной функцией Ca^{2+} —АТРаза служит регуляция $[Ca^{2+}]$ в цитозоле (см. обзоры: [343—345, 441]).

Есть несколько примеров транспорта анионов, не зависящего от $\Delta\mu H$ и $\Delta\mu Na$. В разделе 3.5.8.1 мы рассмотрели один из них, а именно галородопсин, транспортирующий ионы Cl^- в клетки *N. halobium* за счет энергии света. Эта помпа возвращает в клетку ионы Cl^- , которые постоянно ею теряются, перемещаясь электрофоретически через мембрану в направлении изнутри наружу. У моллюска *Aplysia californica* подобная функция выполняется Cl^- —АТРазой, локализованной во внешней клеточной мембране. Фермент чувствителен к ванадату [606].

Солончаковое растение *Limonium vulgaris* выделяет соль на поверхность листьев посредством особой железы, построенной из клеток, во внешней мембране которых обнаружена Cl^- —АТРаза. Предполагается, что этот фермент электрогенно откачивает ионы Cl^- из клетки, а образуемая $\Delta\psi$ (внутри клетки знак «плюс») используется для электрофоретического переноса ионов Na^+ вслед за Cl^- [197, 718].

Показано, что АТФ служит источником энергии для откачки анионов арсената и арсенита из клеток *E. coli*. Эти процессы катализируются двумя различными индуцируемыми системами, обеспечивающими устойчивость бактерии к названным ядам [1268].

Некоторые неионизованные соединения аккумулируются бактериями за счет энергии АТФ или фосфоенолпирувата. Наиболее разработанным примером такого рода является фосфоенолпируваттрансферазная система, катализирующая два процесса — фосфорилирование глюкозы фосфоенолпируватом и аккумуляцию этого сахара в виде глюкозо-6-фосфата некоторыми бактериями. При этом разность в величинах свободной энергии фосфоенолпирувата и глюкозо-6-фосфата используется для создания большого градиента сахара между клеткой и средой (см. обзор: [1290]).

В заключение следует подчеркнуть, что все перечисленные выше системы представляют собой особые механизмы, совершающие осмотическую работу. Огромное большинство процессов концентрирования веществ поддерживается энергией $\Delta\mu H$ или $\Delta\mu Na$. Что же касается мембранной работы химического и механического типов, то здесь во всех без исключения описанных к настоящему моменту случаях движущей силой служит протонный или натриевый потенциал. Вот почему пока что нет оснований постулировать существование какой-то иной мембранной энергетической «валюты», кроме $\Delta\mu H$ и $\Delta\mu Na$.

Мембранная биоэнергетика: некоторые итоги и перспективы

8.1. Фундаментальные исследования

Как ясно из всего изложенного выше, многие проблемы мембранной биоэнергетики уже решены, но, по-видимому, еще больше нам предстоит узнать в ближайшем будущем. Стремительное развитие нашей области науки хорошо иллюстрируется следующими двумя обстоятельствами: о протонной энергетике впервые пошла речь всего четверть века назад, а решающие успехи в описании натриевого мира, альтернативного протонному, были достигнуты буквально в самое последнее время, уже после того как были написаны первые страницы этой книги. Поэтому вряд ли можно сомневаться, что на карте превращений энергии в мембранах есть еще много белых пятен.

В частности, остается неясным, как далеко простираются границы «натриевого мира». Представляется весьма вероятным, что помимо бактерий, перечисленных выше в табл. 17, есть и другие микроорганизмы, прежде всего морские и щелочеустойчивые, которые также используют Na^+ в качестве сопрягающего иона. В этом отношении интересны, например, морские эукариотические водоросли, поскольку они сталкиваются с той же проблемой, что и щелочеустойчивые бактерии *V. alginolyticus*, когда цветение водоема приводит к его зашлачиванию.

Что касается прокариот, располагающих Na^+ -циклом, то здесь остается неясным, существуют ли $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -генераторы, использующие энергию света; сколько $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -генераторов может быть локализовано в дыхательной цепи; каковы молекулярные механизмы генерации и использования $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$.

Последние два вопроса не решены даже для H^+ -транспортирующей дыхательной цепи. До сих пор неизвестно, сколько ионов H^+ транспортируется через митохондриальную мембрану на каждый электрон, перенесенный с NADH на CoQ . Кроме того, не известно ничего определенного о принципе функционирования этого этапа дыхательной цепи митохондрий как преобразователя энергии. Еще больше неясностей, если обратиться к дыхательной цепи бактерий.

Остаются неопределенности в вопросе о том, каковы этапы переноса электрона между двумя фотосистемами в хлоропластах и цианобактериях.

Неясно также, происходит ли трансмембранный перенос зарядов на этапе $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ фотосистеме II. Поэтому мы все еще не можем

составить окончательного суждения об эффективности фотосинтетической редокс-цепи.

Гораздо больший прогресс достигнут в изучении циклической редокс-цепи бактерий-фотосинтетиков. Здесь уже ясно, что генерация $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ есть результат взаимодействия Митчелловой электрон-транспортной «полупетли», включающей хлорофиллы, феофитин, хиноны и цитохром c , и системы Q-цикла, подобной таковой в митохондриях. Для одного из $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов, а именно реакционных центров *Rhodospseudomonas viridis*, получены как структурные (рентген высокого разрешения), так и функциональные (прямое измерение внутримолекулярных смещений зарядов) характеристики, позволившие выяснить принцип действия данного преобразователя энергии. Он состоит во встречном движении электрона и протона, направленном поперек мембраны, причем перенос электрона ответствен за генерацию 95%-ного мембранного потенциала, а остальные 5% приходится на перенос протона.

В Q-цикле также, по-видимому, происходит встречное движение электрона и протона, однако на долю электрона, транспортируемого между двумя гемами цитохрома b , приходится только 40% общего пути переноса зарядов.

Вклады электрона и протона в превращение энергии $\text{NADH} \rightarrow \text{CoQ}$ -редуктазой и цитохромоксидазой пока остаются неизвестными. Ясно лишь, что в последнем случае H^+ переносится на значительное расстояние в глубь мембраны.

В бактериородопсине и трансгидрогеназе через мембрану транспортируется только H^+ , но не e^- . Светозависимая генерация $\Delta\psi$ бактериородопсином складывается из двух основных стадий. Одна из них (меньшая по амплитуде) обусловлена переносом протона в периплазму от Шиффова основания, которым крепится ретиналь к белку. Другая (большая) стадия есть результат переноса протона из цитоплазмы к Шиффову основанию. Два ключевых вопроса остаются неясными применительно к этому механизму: 1) почему сродство Шиффова основания к протону резко снижается после изомеризации остатка ретиналя под действием света и 2) каким образом переносится протон от Шиффова основания в периплазму и из цитоплазмы к Шиффову основанию. Дальнейшая информация здесь может быть получена посредством направленного мутагенеза и ряда других методов, но окончательное решение проблемы вряд ли возможно без рентгеноструктурного анализа с атомным разрешением. Описанный более 10 лет назад Хендерсоном общий контур семи α -спиральных колонн сегодня уже не может удовлетворить исследователей бактериородопсина.

Дальнейший анализ структуры и функции H^+ -АТФ-синтазы необходим для выяснения принципа действия этого важнейшего потребителя $\Delta\bar{\mu}\text{H}$. Все еще неясна стехиометрия $\text{H}:\text{АТФ}$. Обсуждаются величины 2 и 3. Если верна величина 2, то возможен «пря-

мой» механизм, предполагающий, что два протона, переносимые через F_0 , поглощаются непосредственно при образовании той молекулы H_2O , которая получается в результате соединения ADP и фосфата в АТР. Другая возможность состоит в том, что синтез АТР как-то непрямо сопряжен с переносом двух (трех?) протонов через мембрану. Как и в упомянутых выше случаях, структурные исследования высокого разрешения крайне нужны для понимания принципа работы этого ферментного комплекса.

Мы находимся еще в самом начале пути к пониманию механизма H^+ —АТРаз E_1E_2 -типа, обнаруженных во внешней клеточной мембране растений и грибов. Здесь может быть полезно сравнительное изучение этих ферментов и Na^+/K^+ —АТРАЗы, поскольку H^+ —АТРАЗы были описаны гораздо позже и потому изучены не столь подробно, как Na^+/K^+ —АТРаза. Еще позже была открыта H^+ —АТРаза тонопласта. Механизм ее действия совершенно не ясен.

Что касается тех потребителей $\Delta\bar{p}H$, которые осуществляют концентрирование веществ в клетках или органеллах, то большинство такого рода систем, по-видимому, уже описано. Некоторые переносчики очищены и реконструированы в протеолипосомы. В ряде случаев был исследован механизм их действия, хотя без решающих успехов, так что до сих пор приходится довольствоваться гипотетическими схемами, основанными на косвенных (главным образом кинетических) данных. $\Delta\bar{p}H$ -зависимый транспорт белков и нуклеиновых кислот — одна из наиболее интересных проблем в этом разделе биоэнергетики.

Для всех перечисленных выше преобразователей энергии применимы традиционные методы исследования структуры и функции белков. Такие подходы, вероятно, недостаточны, если речь идет о H^+ - и Na^+ -моторах. Прогресс в понимании этих, пожалуй, наиболее своеобразных мембранных трансформаторов энергии требует разработки каких-то совершенно новых подходов. Данная проблема представляется нам особенно важной, поскольку белковые субъединицы, вращающиеся в плоскости мембраны, могут быть составной частью не только флаголярного мотора, но также переносчиков макромолекул, H^+ —АТР-синтазы и т. д.

Изучая механизм транспорта протонов через мембраны, мы должны иметь в виду, что H^+ не уникален как сопрягающий ион. Поэтому схемы, применимые только к H^+ , но не к Na^+ , недостаточны для объяснения всей совокупности превращения энергии в биомембранах.

Многообещающим направлением будущих исследований может стать изучение роли нитчатых и сетчатых митохондрий в качестве внутриклеточных протонных кабелей. Интересен вопрос, возможна ли межклеточная передача энергии через шестимембранные контакты, образованные плазмалеммами и митохондриями соседних клеток.

Функции протонного и натриевого потенциала, не связанные с энергетикой, — таков еще один интригующий аспект рассматриваемых проблем. Среди них регуляция работы мембранных ферментов посредством $\Delta\bar{p}H$ или $\Delta\bar{p}Na$, электрофорез белков и других компонентов вдоль мембран и т. д.

Одна из поразительных особенностей процессов превращения энергии в биомембранах — это трансмембранный перенос поистине огромных количеств протонов и ионов натрия. Так, у взрослого человека через внутренние мембраны митохондрий в день переносится количество протонов, равное примерно 1% веса тела. Проходя сквозь мембрану, протон движется в электрическом поле, достигающем $150 \text{ кВ} \cdot \text{см}^{-1}$. Часть этой массы ионов H^+ , пересекших гидрофобный барьер мембраны по H^+ -проводящим путям $\Delta\bar{p}H$ -генераторов, тотчас возвращается назад, двигаясь через мембрану по H^+ -путям АТР-синтазы и других потребителей $\Delta\bar{p}H$. Другая часть перемещается вдоль митохондриальных филаментов, достигающих в некоторых клетках длины 50 мкм. Эффекты, вызываемые этими крупномасштабными потоками заряженных частиц, представляют особый интерес. Здесь мы должны быть готовы к неожиданностям.

8.2. На пути к прикладной биоэнергетике

8.2.1. Медицинские аспекты

8.2.1.1. Дефекты дыхательной цепи

Сегодня мы находимся в самом начале пути к практическому применению знаний, полученных исследователями энергетики биомембран. Это справедливо, в частности, для медицинских аспектов нашей науки.

Уровень образованности врачей в области биоэнергетики хорошо иллюстрируется тем фактом, что они все еще часто рассматривают инъекцию АТР как способ снабжения энергией больного при патологиях энергетического обмена. Такая практика продолжается, хотя простой расчет показывает, что количество АТР, гидролизуемое человеком до ADP и фосфата за сутки, равно в среднем 40 кг, т. е. в миллион раз больше количества АТР, получаемого с инъекцией.

В литературе есть достаточно много сообщений о патологиях, сопровождающихся тем или иным нарушением в системе окислительного фосфорилирования. По-видимому, таких сообщений было бы гораздо больше, если бы врачи располагали простыми методами диагностики подобных нарушений.

Описаны случаи мутаций в любом из трех дыхательных $\Delta\bar{p}H$ -генераторов. Так, в группе Ленинджера [1073] было показано, что митохондрии новорожденного, погибшего в возрасте 4 мес.,

дефицитны по одному из FeS-компонентов NADH—CoQ-редуктазы. Пападимитриу и соавт. [1166] сообщили о сильном торможении NADH-цитохром *c*-редуктазы в сердечных митохондриях новорожденной, умершей через 4 нед. после рождения. Оказалось, что дефект обусловлен неполноценностью среднего звена дыхательной цепи, а именно уменьшением количества энзиматически восстанавливаемого цитохрома *b*.

Капальди, Чанс и их коллеги [182, 528] описали нарушение того же звена в митохондриях скелетных мышц семнадцатилетней девушки. Здесь также оказалось, что количество восстанавливаемого дыхательной цепью цитохрома *b* резко (в 6 раз) снижено по сравнению с нормой. При этом в CoQH₂-цитохром *c*-редуктазном комплексе отсутствуют по крайней мере четыре типа субъединиц, в то время как уровни цитохромов *c*₁, *c*, *a* и *a*₃ находятся в пределах нормы. Дальнейшие исследования показали, что описанные нарушения были причиной мышечной слабости и лактатного ацидоза, присущих пациентке. Инъекции 10 мг менадиона (витамина K₃) и 1 г аскорбата, производимые каждые 6 ч, привели к частичному восстановлению нарушенной скорости регенерации креатинфосфата в мышце больной после физической нагрузки. Если до лечения эта скорость была в 40 раз меньше, чем в норме, то при лечении она возросла примерно до 50% нормы. Резко улучшилось и самочувствие пациентки. В течение года, предшествовавшего лечению, девушка могла пройти без отдыха расстояние не больше полквартила и обычно передвигалась в инвалидной коляске. Через двое суток после начала инъекций она проходила без остановки четыре квартала и уже не пользовалась коляской.

Благоприятный эффект менадиона легко объяснить его способностью шунтировать свободным окислением начальный и в некоторой степени также и средней сегменты дыхательной цепи [440, 543]. Опыты, проведенные в нашей группе Е. Н. Моховой и В. И. Дедуховой, показали, что менадион активирует сопряженное с генерацией Δ $\bar{p}$ H дыхание, предварительно блокированное ротеноном и антимицином. Этот эффект был продемонстрирован на митохондриях печени и скелетных мышц и на интактных лимфоцитах. Викасол, водорастворимый аналог витамина K, менее токсичный, чем менадион, обладал качественно тем же действием, что и менадион, хотя и в несколько больших количествах [50].

Как уже отмечалось выше, CoQH₂-цитохром *c*-редуктаза и особенно NADH—CoQ-редуктаза блокируются широким кругом чужеродных гидрофобных веществ. В таких случаях интересно было бы исследовать возможный благоприятный эффект менадиона и викасола.

К сожалению, ни менадион, ни викасол не в состоянии помочь, если повреждение цепи находится в цитохромоксидазной облас-

ти. Пример подобной патологии был описан Джонсоном и соавт. [782], показавшими, что определенные виды миопатии коррелируют с исчезновением цитохромоксидазы из некоторых типов скелетных мышц.

Резкое снижение уровня цитохромоксидазы было отмечено в митохондриях хвостатого тела мозга у больных, страдающих болезнью Хантингтона. Предполагается, что этот дефект дыхательной цепи вызывает атрофию хвостатого тела [303].

Меррил и Харрингтон [1020] сделали недавно обзор некоторых врожденных заболеваний, наследуемых по материнской линии и связанных с нарушением структуры и функции митохондрий (см. также обзоры [463, 521, 1349, 1385]). Среди этих патологий есть миопатии, энцефаломиопатии, кардиомиопатии, зрительные нейропатии и ряд других. Помимо наследственных, бывают патологии окислительного фосфорилирования, обусловленные интоксикациями. Так, хроническое спайивание этанола бабуинам вызывает двукратное снижение концентрации цитохромоксидазы и ее активности, а также некоторое уменьшение содержания фосфолипидов (прежде всего фосфатидилхолина и кардиолипина) благодаря активации фосфолипазы A₂ [178]. Отмечено также, что у крыс, получавших этанол, ослабляется связь фактора F₁ с митохондриальной мембраной и снижается эффективность окислительного фосфорилирования [1068]. В крови пациентов, страдающих первичным желчным циррозом, обнаружены аутоиммунные антитела к АТР/АДР-антипортеру [1337]. Резкое торможение окисления пирувата, α-кетоглутарата и пальмитоилкарнитина наблюдается в митохондриях бегунов на длинные дистанции [624].

Иногда биоэнергетические дефекты связаны с нарушением изолирующих свойств митохондриальной мембраны, а не с торможением или отсутствием тех или иных мембранных ферментов. Это вряд ли удивительно, если учесть, что даже небольшое увеличение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, которая исходно крайне мала, приводит к снятию дыхательного контроля.

Впервые патология с подобным нарушением энергетики была описана Эрнстером, Люфтом и их коллегами [544, 965]; см. также: [698]. У пациентки, страдавшей мышечной слабостью, была взята биопсия одной из скелетных мышц и выделены митохондрии. Как оказалось, у таких митохондрий отсутствовал дыхательный контроль. Этот дефект не был следствием гипертиреозидизма, также сопровождающегося гиперметаболизмом и снижением дыхательного контроля (см. обзор: [1385]).

Синдром Рейе, острое детское заболевание (энцефалопатия и жировая инфильтрация внутренних органов) сопровождается появлением в сыворотке крови больших количеств дикарбоновых жирных кислот, вызывающих снятие дыхательного контроля и разобщение [1517, 174]. Многие лекарства и яды обладают

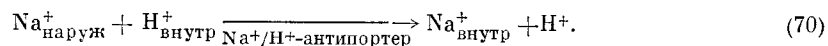
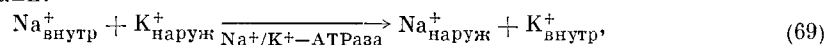
протонофорной активностью. Среди них дикумарин и его аналог антикоагулянт фенилин, бензимидазол и другие гербициды, а также ряд антибактериальных препаратов (см. ниже раздел 8.2.1.4).

Описаны также нарушения натриевой энергетики, присущей внешней клеточной мембране. Примером тому может быть синдром Фалькони, когда Na^+ , метаболит-симпортеры мембраны щеточной каемки утрачивают способность к энергозависимому транспорту метаболитов [1583].

8.2.1.2. Рак: роль Na^+/H^+ -антипортера

В разделе 7.5 мы рассмотрели ряд наблюдений, свидетельствующих об участии Na^+/H^+ -антипортера в регуляции деления клеток. Отмечалось, что диацилглицерид — один из продуктов гидролиза фосфатидилинозитидфосфата, активирует Na^+/H^+ -антипортер при посредничестве протеинкиназы С. В результате ионы водорода начинают откачиваться из клетки в обмен на ионы Na^+ , градиент которых поддерживается Na^+/K^+ -АТразой. Защелачивание, в свою очередь, необходимо для активации синтеза ДНК гормонами.

Существует большая группа данных, что целый ряд онкобелков и ростовых факторов активирует тот или иной этап фосфатидилинозитного каскада, в частности, включает Na^+/H^+ -антипорт (см., например: [1027, 1069, 1469]). Можно полагать, что совместное действие Na^+/K^+ -АТразы и Na^+/H^+ -антипортера (уравнения 69, 70) играет роль в злокачественном перерождении ткани.



Этот механизм должен быть особенно важен для тех опухолей, в которых активирован гликолиз, что в общем характерно для раковых клеток.

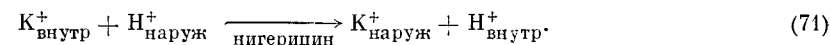
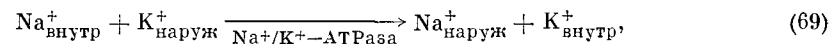
В наиболее быстрорастущих опухолях гликолиз образует 15–40% всего количества АТФ (против 5–20% в нормальных клетках). В некоторых крайних случаях, как, например, в клетках асцитного рака, вклад гликолиза возрастает до 50% [1175]. Повышенная роль гликолиза становится понятной, если учесть, что обычно опухоль находится в гипоксических условиях из-за худшего кровоснабжения.

Na^+/H^+ -антипортер призван поддерживать цитоплазматическую $[\text{H}^+]$ на уровне достаточно низком, чтобы разрешить синтез ДНК, несмотря на постоянную продукцию ионов H^+ гликолизом. Но если это так, то пролиферацию раковых клеток можно было бы затормозить агентами, специфически блокирующими

Na^+/H^+ -антипортер или способствующими возвращению назад в клетку ионов H^+ , откачиваемых антипортером.

К сожалению, пока не найдено специфических ингибиторов с высоким сродством к Na^+/H^+ -антипортеру. Амилорид, тормозящий антипортер при концентрации около $1 \cdot 10^{-4}$ М, в гораздо меньших количествах блокирует Na^+ -каналы [190].

Что касается второго из названных выше подходов, то здесь перспективным представляется использование K^+/H^+ -антипортера нигерицина, который, действуя в паре с Na^+/K^+ -АТразой, может изменить направление потока ионов через внешнюю клеточную мембрану:



Существенно, что нигерицин не только повышает внутриклеточную концентрацию ионов H^+ , но и понижает таковую ионов K^+ . Как было показано Лопец-Ривас и соавт. [954], существует пороговая $[\text{K}^+]_{\text{внутр}}$ (90 мМ), ниже которой синтез ДНК прекращается.

То, что нигерицин действительно способен подкислять цитоплазму, было продемонстрировано, например, Ладзунским и соавт. [1555], исследовавшими мышечные клетки цыплят. Высокая $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$ снимала этот эффект.

Как показали опыты, поставленные в нашей лаборатории Л. Б. Марголисом и И. А. Розовский, нигерицин действительно прекращает синтез ДНК в клетках асцитного рака [86]. При рН, характерном для асцитной жидкости (6,9) $5 \cdot 10^{-6}$ М нигерицин снижал внутриклеточный рН с 6,6 до 6,3. Эта последняя величина была ниже порогового значения рН_{внутр} для синтеза ДНК (рис. 129) [отметим, что порог в асцитной клетке оказался гораздо ниже, чем в активированных фибробластах (6,6 в первом случае и 7,3 во втором — см. раздел 7.5)]. Окраска этилродамином показала, что использованные концентрации нигерицина не влияют на $\Delta\Psi$ митохондрий в асцитных клетках.

Еще одна возможность закислить цитоплазму — это активировать гликолиз. Не исключено, что именно снижением рН в опу-

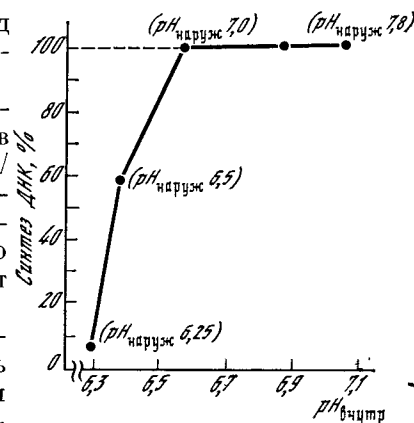


Рис. 129. Синтез ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха как функция внутриклеточного рН (по: Марголис и соавт. [86])

холевых клетках объясняется благоприятное терапевтическое действие гипергликемии при некоторых злокачественных заболеваниях. Можно надеяться, что как нигерицин, так и гипергликемия будут действовать на пролиферацию прежде всего опухолевых клеток, а не нормальных, где ниже скорость гликолиза. В упомянутых выше опытах на асцитных клетках добавление глюкозы и анаэробиз снижали действующую концентрацию нигерицина до $5 \cdot 10^{-7}$ М.

8.2.1.3. Рак: противоопухолевое действие проникающих катионов

По данным Чена и соавт. [247, 248, 900, 1494], метилродамин (родамин 123), проникающий через мембраны в катионной форме [1359], тормозит рост клеток карциномы (см., однако, [1256]). Как отмечалось в разделе 6.2.4.4, метилродамин движется в цитоплазму и далее в матрикс митохондрий под действием $\Delta\psi$, образуемой соответственно Na^+/K^+ —АТФазой и ΔpH -генераторами дыхательной цепи. Накопление больших количеств метилродамина внутри митохондрий вызывает торможение дыхания [901]. Такой эффект может стимулировать гликолиз (снимается пастеровский эффект), а следовательно, и способствовать закислению цитоплазмы. Последнее должно подавлять синтез ДНК, как это было показано в предыдущем разделе.

Опыты, проведенные в нашей лаборатории Ю. Н. Антоненко, продемонстрировали, что не только производные родамина, но и еще некоторые противоопухолевые препараты являются проникающими катионами. По данным В. А. Драчева и Д. Б. Зорова [55], освещение дезэнергизует митохондрии в клетке, окрашенной этилродамином. Сообщалось также, что некоторые опухоли специфически накапливают гемин. В этих случаях световая терапия оказывается эффективной [238, 482].

Рассматривая подобные данные, необходимо учесть, что проницаемость фосфолипидных мембран для гидрофобных катионов значительно ниже, чем для анионов той же гидрофобности [82]. Движение катионов через мембрану особенно затруднено, если оно происходит против сил электрического поля. Это означает, что катион, скажем, родамин, будет быстро аккумулялироваться во внешнем клеточном слое ткани, но вряд ли достигнет следующих слоев. Чтобы сделать это, родамину пришлось бы выйти из клетки первого слоя, двигаясь против поля («минус» внутри клетки). Движение катиона в глубь ткани по межклеточникам сильно затруднено из-за плотной упаковки клеток.

Ситуация меняется в опухоли, где упаковка клеток не столь плотная и регулярная, как в норме. Здесь катион может достичь внутренних клеточных слоев, диффундируя по межклеточникам. Вот почему можно, как нам кажется, надеяться, что про-

никающие катионы-ингибиторы будут влиять преимущественно на опухолевые, а не на нормальные ткани.

Отмечено, что катионные антибиотики тетрациклины, которые специфически блокируют синтез белка в митохондриях, сильно тормозят рост опухолей, вызванных канцерогенами, а также развитие трансплантальной гипернефротомы [885]. Эти и другие наблюдения указывают, что митохондрии могут быть мишенью при химиотерапии рака.

Другой аспект проблемы был рассмотрен Глангером и Ленинджером [637], показавшими, что повреждение раковых клеток цитотоксическими макрофагами в клеточной культуре сопровождается почти полным торможением NADH — CoQ -редуктазы. Механизм этого эффекта остается неясным.

В такой-то мере сходный эффект был описан Сингером и соавт. [1238, 1239] при изучении паркинсонизма, вызванного деградацией допаминообразующих нейронов (черной субстанции) под действием 1-метил-4-фенил-N-метил-1,2,3,6-тетрагидропиридина. Действующим началом оказался один из продуктов окисления названного вещества — 4-фенил-N-метилпиридинийкатион (MPP^+), электрофоретически накапливающийся в митохондриях и блокирующий дыхательную цепь между NADH -дегидрогеназой и CoQ . Можно задаться вопросом, почему страдает именно черная субстанция. В данном конкретном случае ответ известен: именно в этой ткани мозга происходит энзиматическое образование MPP^+ из предшественника. Во многих аналогичных ситуациях, мы, однако, не столь информированы. Так, никому пока не известно, почему введение в куриное яйцо антимицина А, специфического ингибитора CoQH_2 -цитохром c-редуктазы блокирует формирование сердца, в то время как другие органы эмбриона продолжают свое развитие.

8.2.1.4. Действие антимикробных агентов, направленное на системы мембранной энергетики

Мембранные системы микроорганизмов в известной мере подобны, но не идентичны таковым млекопитающих. Поэтому можно надеяться, что удастся найти ингибиторы, специфически блокирующие энергетические системы микро-, но не макроорганизма. Иногда такой подход оказывается успешным. Например, были синтезированы оксинафтохиноны, очень низкие концентрации которых полностью подавляют средний сегмент дыхательной цепи митохондрий из патогенного простейшего (кокцидии) *Eimeria tenella*. При этом митохондрии млекопитающих остаются незатронутыми [589]. Ряд нафтохинонов обладает антималярийной активностью, специфически подавляя дыхательную цепь *Plasmodium lophurae* и *P. vivax* (см. ссылки: [589]).

Если лекарственный препарат действует на мембранные системы как микробов, так и человека, то он безопасен только при наружном употреблении. Таков, например, грамицидин D, образующий H^+ -, Na^+ - и K^+ -проницаемые каналы в фосфолипидных бислоях.

Недавно было показано [426, 1504], что в сыворотке крови человека существует система, убивающая грамотрицательные бактерии посредством каналобразующего белкового фрагмента, который может получаться при расщеплении тромбина бактериями. Процесс требует определенных рецепторов на внешней и протонного потенциала на внутренней бактериальных мембранах. Все эти свойства (протеолиз, рецепторы и необходимость $\Delta\bar{p}H$) присущи некоторым колицинам — бактерицидным белкам, образующим определенными штаммами *E. coli* [426].

Еще одна аналогия мембраноактивной системы микроба и млекопитающего была описана Юнгом и соавт. [1642, 1643]. Как цитотоксический эффект *Entamoeba histolytica*, так и умерщвление клеток-мишеней иммунной системой достигается сходным образом действующими белками, которые дезэнергизуют внешнюю мембрану клетки млекопитающего посредством образования в ней ионпроводящих пор.

Известны антибактериальные препараты, по характеру действия не имеющие отношения к биоэнергетике, которые накапливаются в бактериях за счет $\Delta\bar{p}H$. Таковы, например, стрептомицин и гентамицин [322, 525, 996, 1036]. В случае гентамицина активной оказалась $\Delta\Psi$ -составляющая $\Delta\bar{p}H$ [525]. То же самое обнаружилось при изучении 2-N-метилэллиптицина, убивающего *Streptococcus pneumoniae*. Мутант *S. pneumoniae*, имеющий сниженную $\Delta\Psi$, оказался устойчивым к этому лекарству [1307]. Иногда не вход, а выброс антибиотика оказывается энергозависимым. Так, штамм *E. coli* с плазмидой, обеспечивающей устойчивость к тетрациклину, активно откачивает этот агент из клетки [813, 1014]. Подобные отношения показаны для штаммов, устойчивых к арсенату и арсениту (см. раздел 7.7). Такие эффекты следует учитывать при разработке стратегии антибактериальной терапии.

Открытие «натриевого мира» может иметь значение для лечения патологий, вызываемых *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* и другими его представителями. В борьбе с такими бактериями препараты, снижающие $\Delta\bar{p}H$, должны быть малоэффективны. В то же время, комбинируя протонатор с моненсином, можно надеяться получить бактерицидное действие.

По мнению Вольфарта и Букеля [1612], благоприятный эффект моненсина на рост телят [1207] можно объяснить его действием на *Veilonella alcalescens*, живущую в рубце жвачных. Как отмечалось в разделе 7.1.1, эта бактерия располагает Na^+ -транспортующей декарбоксилазой.

8.2.2. Два примера возможного технологического применения мембранной биоэнергетики

Биотехнология развивается столь стремительно, что для этой области вскоре уже можно будет построить «здание», подобное «зданию биологии», приведенному в разделе 1.1. Поэтому мы далеки от мысли дать здесь обзор многочисленных аспектов технической биоэнергетики: для этого потребовалась бы еще одна, отдельная книга. Мы затронем лишь две проблемы, которые представляются перспективными в связи с прогрессом в понимании устройства мембранных преобразователей энергии.

8.2.2.1. Регенерация АТР за счет энергии света

Среди ключевых проблем энзиматической инженерии называют регенерацию АТР. Есть несколько путей синтезировать АТР из АДФ и фосфата. Например, можно неэнзиматически получить из ацетилхлорида ацетилфосфат, субстрат ацетилфосфокиназы, фосфорилирующей АДФ до АТР. Этот фермент, будучи получен из термофильной бактерии, отличается большой стабильностью. Данный метод требует постоянного притока ацетилфосфата в реакционную смесь, где происходит биотехнологический процесс, обеспечиваемый энергией АТР.

Гораздо удобнее регенерировать АТР прямо в том объеме, где он тратится. Идеальный путь решения проблемы состоит в использовании бактериальных хроматофоров или протеолипосом способных к синтезу АТР из АДФ и фосфата за счет световой энергии.

Ларетта Гарде и соавт. [907] показали, что хроматофоры *Rhodospseudomonas capsulata*, обработанные глутаральдегидом в присутствии альбумина, сохраняют способность к фотофосфорилированию в течение 5 ч. Дальнейшая оптимизация подобной системы выглядит вполне перспективной.

Другой подход — использование протеолипосом. Термофильные бактерии могли бы служить источником всех необходимых ингредиентов: $\Delta\bar{p}H$ -генерирующих ферментов, H^+ —АТР-синтазы и липидов. Как уже отмечалось в разделе 1.6, липиды таких бактерий могут образовывать очень прочную мембрану, фактически представляющую собой бислой, в котором два монослоя ковалентно связаны друг с другом (см. также [616]).

Протеолипосомы, построенные из названных выше компонентов, могли бы быть стабильной системой регенерации АТР. В качестве $\Delta\bar{p}H$ -генератора перспективен бактериородопсин из *H. halobium*, которая, между прочим, не только гало-, но и термофильна.

8.2.2.2. Натриевый цикл у плесневых бактерий

Использование световой энергии для получения биомассы является важным аспектом технической биоэнергетики. Здесь особый интерес представляют цианобактерии. Поскольку эта группа микроорганизмов относится к царству бактерий, мы можем применить к ним весь арсенал бактериальной геномной инженерии. В то же время они уже располагают системой образования O_2 и углеводов из H_2O и CO_2 .

Чтобы внести заметный вклад, скажем, в обеспечение индустрии СССР топливом за счет биомассы цианобактерий, необходимо повысить выход этой биомассы, поскольку при имеющихся величинах продуктивности (около 20 г водорослей на 1 м² в день [111]) потребовался бы водоем площадью порядка 10^5 км². В этом отношении следовало бы обратить внимание на цианобактерии, имеющие Na^+ -цикл в своей цитоплазматической мембране. Дело в том, что они могут продолжать размножаться и образовывать биомассу даже тогда, когда «цветущий» водоем зашелочился до такой степени, что обычные представители протонного мира уже не выживают. Еще одно преимущество «натриевых» бактерий — их большая устойчивость в неблагоприятных, в частности, агрессивных средах. Как уже отмечалось в разделе 7.4, наиболее распространенный первый ответ мембраны на повреждающее воздействие — это повышение протонной проводимости и, следовательно, рассеяние энергии, если энергетика базируется на циркуляции протона. В случае же натриевой энергетики повышение H^+ -проводимости приведет к превращению $\Delta\psi$ в ΔpNa без существенного снижения общей $\Delta\bar{\mu}Na$.

Первый пример цианобактерий с «натриевой» цитоплазматической мембраной был описан в нашей группе И. И. Броуном и соавт. [30]. Им оказалась алкало- и галотолерантная *Oscillatoria brevis*. Можно полагать, что *Spirulina* из оз. Чад также относится к «натриевым» цианобактериям, поскольку для этого водоема характерны щелочной pH и высокая концентрация Na^+ . Температура воды в этом экваториальном озере тоже достаточно высока. Устойчивость к высокой температуре служит еще одним фактором, благоприятным для жизни в агрессивных средах, поскольку как ферменты, так и мембраны термофилов отличаются повышенной стабильностью (см. предыдущий раздел). Коль скоро речь зашла о спиролине, отметим, что ее биомасса пригодна не только как топливо, но и как пища.

Вообще щелоче- и температуроустойчивые бактерии следует иметь в виду при поиске путей совершенствования различных микробиологических производств, имеющих дело с агрессивными средами. В частности, «натриевые» метанобактерии (раздел 7.2.3) могут представлять интерес для селекции микробов, способных образовывать метан из самых разнообразных отходов.

Глава 9

Исторический очерк исследований по энергетике мембран

Как правило, авторы учебников помещают исторический обзор в начало книги. Мы решили отступить от этой традиции, полагая, что читателям было бы трудно понять все перипетии увлекательной эпопеи, о которой пойдет речь ниже, без специальных сведений, изложенных в предыдущих главах.

В некоторых частных случаях, таких, например, как выяснение функции карнитина, мы описывали хронологию открытий и наблюдений, приведших к современному пониманию проблемы. Теперь нам предстоит проследить развитие мембранной биоэнергетики на главном ее направлении.

9.1. Первые идеи и наблюдения. Хемиосмотическая гипотеза

Не может быть сомнений в том, что осознание центральной роли протонного потенциала в мембранных процессах превращения энергии сыграло решающую роль в становлении мембранной биоэнергетики в качестве самостоятельной отрасли биологических знаний. Это событие было подготовлено открытиями: 1) мембран как структурных компонентов, присущих любой живой клетке (об истории мембранологии см.: [420]), и 2) двух наиболее важных процессов превращения энергии, которые, как оказалось впоследствии, локализованы в мембранах. Мы имеем в виду открытие окислительного фосфорилирования В. А. Энгельгардтом (1930—1932 гг., СССР [146, 536, 537]) и фотофосфорилирования Арноном (1954 г., США [187—189]).

Важными этапами исследования окислительного фосфорилирования явилось доказательство синтеза АТФ при переносе электронов в дыхательной цепи (В. А. Белицер и Е. Т. Цыбакова, 1939 г. [18]) и выяснение локализации этого процесса в митохондриях (Кеннеди и Ленинджер, 1949 г. [836]). Говоря о работах 1940-х годов, следует отметить открытие А. А. Красновским светозависимой оксидоредукции хлорофилла [76].

Мысль о том, что циркуляция протонов, пересекающих гидрофобный барьер мембраны, лежит в основе сопряжения окислительно-восстановительных реакций и синтеза АТФ, была впервые сформулирована Митчеллом (1961 г., Великобритания [1043]) и вошла в историю науки под названием хемиосмотической гипотезы. Фактически цитируемая работа Митчелла уже содержала

все основные постулаты концепции протонного цикла. Митчел предположил, что сопрягающие мембраны несут $\Delta\mu\text{H}$, составленную из $\Delta\psi$ и $\Delta\mu\text{H}$, и что $\Delta\mu\text{H}$ генерируется дыхательной цепью или H^+ —АТРазой, встроенными в мембрану. Если $\Delta\mu\text{H}$, образованная редокс-цепью, достаточно велика, чтобы развернуть вспять АТРазную реакцию, то H^+ —АТРаза может катализировать синтез АТР. Тем самым $\Delta\mu\text{H}$ оказывается фактором, сопрягающим окисление и фосфорилирование.

Истоки этой идеи надо, по-видимому, искать в работах Лундегарда, который еще в 1945 г. предположил, что цепь переноса электронов может быть расположена поперек мембраны. Работа такой цепи должна привести к выделению ионов H^+ на одной стороне мембраны и поглощению H^+ на другой ее стороне. Это предположение было вскоре подхвачено Конвеем и Брэйди [399], пытавшимися объяснить таким способом секрецию кислоты в желудке. Хотя в действительности этот процесс катализируется не редокс-цепью, а K^+/H^+ —АТРазой (см. раздел 4.5.4), работа Конвея и Брэйди сыграла свою положительную роль, привлекая внимание биохимиков к взглядам Лундегарда на метаболизм как на процесс векторный по отношению к определенным внутриклеточным ориентирам.

В начале 1950-х годов Дэвис, Огстон и Кребс [436, 437] впервые рассмотрели возможную роль разделения зарядов в окислительном фосфорилировании. Однако в представленной авторами сложной схеме, включавшей две редокс-цепи, протоны были необходимы для сопряжения одних оксидоредукций с другими, а синтез АТР сам по себе не требовал разделения зарядов. В 1960 г. Робертсон [1259] постулировал схему, где стадия разделения зарядов находилась между редокс-реакциями и синтезом АТР. Однако эта идея не была развита ее автором. Позднее Робертсон с горечью заметил: «У меня не хватило проницательности предположить, что расщепление АТР может привести к разделению зарядов и потому к движению ионов. Подобная возможность была ясно осознана Митчелом примерно в это же время» [1260, с. 6].

Предположив концепцию обратимой H^+ —АТРазы, Митчел завершил создание схемы протонного цикла, которая со временем стала новой рабочей гипотезой энергетического сопряжения, противостоящей так называемой химической схеме, предполагавшей прямое химическое взаимодействие ферментов дыхания и фосфорилирования.

В этом же 1961 г., когда Митчел опубликовал свою гипотезу, Уильямс [1601] также предположил, что перенос зарядов — необходимый этап окислительного фосфорилирования. Однако, по его схеме, замкнутая мембранная структура не нужна для сопряжения, так как заряды могут переноситься не поперек мембраны, а вдоль нее.

В то время было несколько причин, побудивших к поиску гипотез, альтернативных химической схеме. Вот некоторые из них.

1. Во многих лабораториях были предприняты попытки обнаружить высокоэнергетический интермедиат, состоящий из дыхательного фермента или кофермента и компонента АТР-синтазы. Хотя этот интермедиат занимал на химической схеме центральное место, никому не удавалось ни наблюдать, ни тем более выделить такого рода соединение.

2. Химическая схема не давала объяснения необходимости замкнутых мембранных структур для окислительного и фотосинтетического фосфорилирования.

3. Было найдено, что группа соединений, очень различных по химической структуре, вызывает весьма характерное изменение митохондриальной энергетики, получившее название разобщения. Вещества-разобщители вызывали торможение фосфорилирования и стимуляцию как дыхания, так и гидролиза АТР.

9.2. Разобщители

Действие первого разобщителя, 2,4-динитрофенола, на окислительное фосфорилирование было продемонстрировано Лумисом и Липманом в 1948 г. [952]. Затем обнаружилось, что разобщающим действием обладают также пентахлорфенол, дикумарол, салицилат, производные бензимидазола и фенилгидразона. Согласно химической схеме, разобщители должны замещать фосфат или какой-то другой компонент в предполагаемом высокоэнергетическом интермедиате. Однако трудно было себе представить, что такую специфическую функцию могут выполнять вещества, столь сильно различающиеся по своей химической структуре. Митчел был первым, кто обратил внимание на факт, что все разобщители — слабые кислоты, растворимые в жиру. Он предположил, что разобщители суть переносчики протонов, разряжающие $\Delta\mu\text{H}$ [1043]. Именно этот постулат хемиосмотической гипотезы оказался первым, который получил подтверждение в прямом эксперименте.

В 1966 г. Ленинджер и соавт. [257] обнаружили снижение электрического сопротивления плоских искусственных фосфолипидных мембран динитрофенолом. В 1967 г. наша группа совместно с Е. А. Либерманом и его коллегами [1423, 1424] провела сравнение активности целой группы разобщителей в природной и модельной системах, а именно в митохондриях и плоских фосфолипидных мембранах. Было установлено, что ряды активностей испытанных соединений как разобщителей и протонофоров совпадают. Мы сформулировали правило, что любое вещество, повышающее H^+ -проводимость искусственной мембраны, должно обладать разобщающей активностью. Используя этот подход, мы описали целый ряд новых веществ-разобщителей.

В 1967 г. Чэппелл и Хаархофф [368] нашли, что мембрана липосом становится проницаемой для ионов водорода в присутствии одного из разобщителей. Митчел показал, что это имеет место и в случае митохондриальной мембраны [1046]. Впоследствии упомянутые выше результаты были подтверждены в опытах на интактных митохондриях из разных источников, хлоропластах, бактериях, их фрагментах и протеолипосомах (см. обзоры: [126, 1013]).

9.3. $\Delta\mu\text{H}$ на природных мембранах

В 1966—1969 гг. Митчел и Мойл предприняли систематическое исследование ряда сопрягающих мембран (митохондрии и бактерии) с целью обнаружения на них $\Delta\psi$ и ΔpH [1046, 1058, 1059, 1061, 1047, 1062]. В частности, было показано, что включение дыхания добавкой O_2 к анаэробной суспензии митохондрий или бактерий, инкубируемых с валиномицином, вызывает чувствительное к разобщителю увеличение $[\text{H}^+]_{\text{наруж}}$ и уменьшение $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$. Авторы интерпретировали этот факт как указание в пользу генерации соответственно ΔpH и $\Delta\psi$, предполагая, что внутренность митохондрий и бактерий при дыхании становится более щелочной и отрицательной в сравнении с инкубационной средой.

Валиномицин впервые был применен в биоэнергетике Муром и Прессманом в 1964 г. [1071]. Авторы описали валиномицинзависимое поглощение ионов K^+ энергизованными митохондриями. Было сделано предположение, что в митохондриях существует белковый рецептор, ответственный за эффект валиномицина.

Однако уже в 1966—1967 гг. удалось показать повышение K^+ -проницаемости чисто липидных модельных мембран — плоских (Лев и Бужинский [77] и Мюллер и Рудин [1080]) и липосомальных (Чэппелл и Хаархофф [368]). Это свидетельствовало в пользу правомочности использования валиномицина как калиевого понофора для измерения $\Delta\psi$ в цитированных выше опытах Митчела и Мойл. Тем не менее адвокаты химической схемы предположили, что валиномицин «прошивает» внутримембранный гидрофобный барьер, который в отсутствие ионофора препятствует доступу ионов K^+ к гипотетической $\text{K}^+ - \text{АТР}азе$. $\text{K}^+ - \text{АТРа}$ действительно была впоследствии обнаружена у *E. coli*, растущих при низкой $[\text{K}^+]_{\text{наруж}}$, а также в некоторых особых случаях во внешней мембране животной клетки (см. разделы 4.5.3 и 7.7).

Чтобы исключить такую возможность, в 1969—1970 гг. группа Е. А. Либермана и наша лаборатория сделали попытку заменить ион K^+ на какие-либо синтетические ионизированные соединения. В опытах с БЛМ было испытано множество синтетических кислот и оснований, что позволило выявить группу соединений,

способных проникать через искусственные мембраны в своей заряженной форме. Эти проникающие ионы инкубировали с неэнергизованными митохондриями. Затем митохондрии энергизовали и следили за концентрацией понов в инкубационной смеси. Как оказалось, энергизация вызывает поглощение митохондриями катионов и выход из них анионов. Эффект зависел от гидрофобности и знака заряда иона, в то время как детали его химической структуры были несущественны. Знак заряда определял направление движения иона [935, 936].

Впоследствии метод проникающих ионов был применен для измерения $\Delta\psi$ на бактериальных мембранах (см. обзоры: [684, 1410]). Электрохромный сдвиг пигментов фотосинтетической мембраны был использован Виттом и соавт. [1608], чтобы следить за $\Delta\psi$ в хлоропластах и некоторых бактериях-фотосинтетиках [1608]. В 1970-е годы были разработаны флюоресцентные зонды на ΔF , подтвердившие данные, полученные нашим методом и методом Витта.

В нашей группе субмитохондриальные частицы и хроматофоры бактерий были сорбированы на мембранные фильтры, импрегнированные фосфолипидами. В этой системе генерацию ΔF за счет энергии дыхания, света или АТР удалось измерить вольтметром, соединенным с двумя электродами, помещенными по обе стороны фильтра [226, 876, 1405].

В нескольких лабораториях была измерена ΔpH на сопрягающих мембранах. С этой целью $\text{pH}_{\text{наруж}}$ определяли pH -электродом или непроницающим pH -индикатором. Для измерения $\text{pH}_{\text{внутр}}$ применили подход, предложенный ранее в опытах с проникающими ионами, с той лишь разницей, что вместо солей сильных кислот и оснований использовали соли слабых кислот и оснований. Как направление, так и величина ΔpH оказались в соответствии с предсказаниями Митчела. Отсек, при энергизации заряжающийся отрицательно, защелачивался, причем этот эффект возрастал в присутствии проникающих ионов. Общая величина $\Delta\mu\text{H}$ обычно составляла порядка 150—250 мВ [126, 684].

9.4. $\Delta\mu\text{H}$ на реконструированных мембранах

Главная трудность в интерпретации измерений $\Delta\mu\text{H}$ на природных мембранах состоит в сложности исследуемой системы, включающей множество ферментов и переносчиков. Например, не исключено, что $\Delta\mu\text{H}$ — не интермедиат, связывающий дыхание и $\text{H}^+ - \text{АТР-синтазу}$, а побочный продукт одного из этих двух механизмов.

Чтобы упростить ситуацию, были предприняты исследования по реконструкции модельных мембран, инкрустированных каким-либо одним $\Delta\mu\text{H}$ -генератором. Первые публикации такого

рода опытов появились из лаборатории Ракера в самом начале 1970-х годов. Кагава и Ракер [804] реконструировали мембранные пузырьки из фосфолипидов и митохондриальной H^+ —АТР-синтазы. Опыты с применением валиномицина и разобщителя указывали на АТР-зависимую генерацию $\Delta\bar{p}H$.

Подобный подход был вскоре применен Хинклем и др. [728] в группе Ракера и А. А. Ясайтисом и др. [774] в нашей группе с целью реконструкции цитохромоксидазного $\Delta\bar{p}H$ -генератора. Добавив в среду реконструкции цитохромоксидазу и H^+ —АТР-синтазу, Ракер и Кэндрэч [1228] получили пузырьки, синтезировавшие АТР при переносе электронов с восстановленного цитохрома *c* на кислород. Обязательное условие состояло в том, что донором электронов служил цитохром *c*, заключенный внутри пузырька. Если действовал также и внешний цитохром *c*, то дыхание уже не поддерживало синтеза АТР.

В рамках гипотезы Митчела ингибиторный эффект внешнего цитохрома *c* можно было легко объяснить, предположив, что в реконструированных пузырьках имелись две популяции цитохромоксидаз, ориентированных противоположным образом. Включение как тех, так и других приводило к генерации протонных потенциалов противоположного знака, так что результирующая $\Delta\bar{p}H$ оказывалась незначительной по своей абсолютной величине.

Чтобы проверить это предположение, мы применили метод проникающих ионов и показали, что протеолипосомы с цитохромоксидазой и H^+ —АТРазой генерируют $\Delta\psi$ внутри со знаком «минус» при окислении внешнего цитохрома *c* и со знаком «плюс» при окислении внутреннего цитохрома *c* или при гидролизе АТР [774]. Эти результаты были подтверждены затем в других лабораториях посредством различных индикаторов $\Delta\psi$ и ΔpH (см. обзоры: [684, 1226, 1227]), а также в нашей лаборатории с использованием прямой регистрации $\Delta\psi$ вольтметром [226, 487, 488, 490, 871].

Эксперименты, описанные выше, ясно показали необходимость $\Delta\bar{p}H$ для окислительного фосфорилирования и способность как дыхательной цепи, так и митохондриальной АТРазы генерировать $\Delta\bar{p}H$ одного и того же направления.

9.5. Образование АТР за счет искусственно созданной $\Delta\bar{p}H$

Итак, $\Delta\bar{p}H$ необходима для синтеза АТР в митохондриях, хлоропластах и бактериях. Но достаточна ли она для этого процесса? Положительный ответ на этот вопрос означал бы завершение доказательства хемиосмотической гипотезы.

Предсказание Митчела состояло в том, что искусственно созданные $\Delta\psi$ и ΔpH могут поддерживать синтез АТР в отсутствие

переноса электронов по дыхательной или фотосинтетической редокс-цепям.

Первое наблюдение, свидетельствовавшее о справедливости этого постулата, было сделано еще в 1966 г. Ягендорфом и Юрайбом [766], описавшими «темновой» синтез АТР при переносе хлоропластов из кислой среды в щелочную, что имитировало генерацию ΔpH на свету. Дальнейшие исследования подтвердили это наблюдение и расширили круг объектов, на которых удается продемонстрировать подобный феномен. Было показано, что не только хлоропласты, но и митохондрии, бактерии и протеолипосомы синтезируют АТР на искусственно созданных ΔpH и $\Delta\psi$ (см. обзор: [1399]).

9.6. Бактериородопсин и химерные протеолипосомы

Логически рассуждая, опыты, описанные выше, сами по себе представляются достаточными для заключения о справедливости хемиосмотической гипотезы. Однако инерция мышления была столь велика, что позиция Митчела и его сторонников все еще оставалась далекой от всеобщего признания вплоть до середины 1970-х годов. От автора концепции, первоначально казавшейся фантастичной, ожидали предсказаний все новых и новых чудес. Оппоненты постоянно атаковали каждый вновь полученный аргумент, свидетельствующий о предсказательной силе гипотезы, вновь и вновь пытались объяснить энергетическое сопряжение в рамках если не химической гипотезы, то так называемой конформационной схемы или концепции Уильямса. Они говорили, что intactные мембраны слишком сложны, а реконструированные — слишком артефактны. Опыты с искусственно созданной $\Delta\bar{p}H$ критиковали в связи с небольшими абсолютными количествами образованного АТР (что было в общем-то понятно, если учесть малый внутренний объем митохондрий, бактерий и т. п.).

Последней каплей, перевесившей чашу весов в пользу Митчела, явились опыты с бактериородопсином. В 1971 г. Остерхельт, Блаурок и Стокениус [266, 1126] описали новый белок бактериородопсин, ответственный за утилизацию световой энергии галофильными бактериями. В 1973 г. Остерхельт и Стокениус [1127] показали светозависимый выброс ионов H^+ из клеток *H. halobium*. Эффект был опосредован бактериородопсином и снимался разобщителями.

В 1974—1975 гг. Остерхельт и Стокениус и независимо наша группа обнаружили способность галобактерий к фотофосфорилированию [20, 427]. Примерно в это же время мы реконструировали протеолипосомы с бактериородопсином и показали на них генерацию $\Delta\psi$ и ΔpH под действием света [824]. Так было продемонстрировано, что бактериородопсин — светозависимый $\Delta\bar{p}H$ -

генератор, а образуемый им протонный потенциал может затем использоваться для синтеза АТР. Вновь открытая система фотофосфорилирования во всем отличалась от той, что была описана на 20 лет раньше Арноном в хлоропластах. Единственное обстоятельство, оказавшееся общим для этих двух систем, состояло в необходимости $\Delta\bar{p}H$ для синтеза АТР.

В 1974 г. Ракер и Стокениус [1229] реконструировали протеолипосомы из смеси бактериородопсина, H^+ —АТР-синтазы из сердечных митохондрий быка и соевых фосфолипидов. Пузырьки, сделанные из компонентов всех трех царств живых существ (бактерий, животных и растений), оказались способными к фотофосфорилированию. В этой системе H^+ —АТР-синтаза утилизировала $\Delta\bar{p}H$, образуемую способом, абсолютно отличным от природного ($\Delta\bar{p}H$ -генератором служил бактериородопсин, а не дыхательная цепь). Система напоминала синтез АТР за счет энергии искусственно созданной $\Delta\bar{p}H$. Однако протеолипосомы с бактериородопсином и H^+ —АТР-синтазой имели одно важнейшее преимущество. В этой химерной системе фосфорилирование происходило до тех пор, пока не выключишь свет, т. е. процесс уже не был ограничен малым внутренним объемом мембранного пузырька, препятствовавшим демонстрации синтеза АТР, постоянного во времени.

Результаты всех этих опытов столь очевидно противоречили «анти-Митчеловым» концепциям, что произошел решительный сдвиг в умонастроениях сообщества биоэнергетиков. Хемиосмотическая гипотеза была принята большинством исследователей. Последнее подтверждение триумфа своей концепции Митчел получил из рук короля Швеции — Нобелевскую премию по химии за 1978 г.

9.7. Новейшая история

После того как хемиосмотическая гипотеза стала ведущей концепцией мембранной биоэнергетики, возникли две крайние тенденции: одни слепо следовали за автором гипотезы, «бодминским оракулом», другие пытались разрушить «интеллектуальный собор», воздвигнутый Митчелом и его сподвижниками (приверженцы этой второй тенденции вполне могли быть причислены к потомкам Герострата).

В течение последних десяти лет дискуссии в биоэнергетике происходили в основном вокруг вопроса о судьбе ионов H^+ , пересекающих гидрофобный слой мембраны по протонпроводящим путям $\Delta\bar{p}H$ -генераторов.

Разбавляются ли эти ионы H^+ в водной фазе или, наоборот, транспортируются вдоль поверхности раздела мембрана/вода (или внутри мембраны) к ближайшему потребителю $\Delta\bar{p}H$? Какова точ-



Биоэнергетики

Первый ряд (слева направо) — Д. АРНОН, М. БАЛЧЕВСКИ, В. А. БЕЛИЦЕР;
второй ряд — П. БОЙЕР, М. ВИКСТРЕМ, Х. Т. ВИТТ;
третий ряд — Д. ГРИН, П. ДИМРОТ, Я. КАГАВА



Биоэнергетики

Первый ряд (слева направо) — Д. АРНОН, М. БАЛЧЕВСКИ, В. А. БЕЛИЦЕР,
второй ряд — П. БОЙЕР, М. ВИКСТРЕМ, Х. Т. ВИТТ,
третий ряд — Д. ГРИН, П. ДИМРОТ, Я. КАГАВА



Первый ряд — М. КЛИНГЕНБЕРГ, Х. КОРАНА, А. А. КРАСНОВСКИЙ;
 второй ряд — Г. КРЕБС (медаль ФЭБО), А. П. ЛЕНИНДЖЕР, Ф. ЛИПМАН;
 третий ряд — П. МИТЧЕЛ (слева) при получении Нобелевской премии от короля Швеции
 Карла Густава (1978 г.), Х. МИДЕЛЬ, Нобелевский лауреат 1986г.



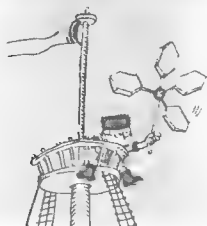
Первый ряд — Ю. А. ОВЧИННИКОВ, Д. ОСТЕРГАЛЬТ, Э. РАКЕР;
 второй ряд — С. Е. СЕВЕРИН, Э. К. СЛЕПТЕР, У. СТОКЕНИУС;
 третий ряд — А. СИНГН-ДЕРДИ, Т. УНЕМОТО, Б. ХЕСС



Первый ряд — М. КЛИНГЕНБЕРГ, Х. КОРАНА, А. А. КРАСНОВСКИЙ;
 второй ряд — Г. КРЕБС (медаль ФЕБО), А. Л. ЛЕНИНДЖЕР, Ф. ЛИПМАНН;
 третий ряд — П. МИТЧЕЛ (слева) при получении Нобелевской премии от короля Швеции
 Карла Густава (1978 г.), Х. МИХЕЛЬ, Нобелевский лауреат 1988г.



Первый ряд — Ю. А. ОВЧИННИКОВ, Д. ОСТЕРХЕЛЬТ, Э. РАКЕР;
 второй ряд — С. Е. СЕВЕРИН, Э. К. СЛЕЙТЕР, У. СТОКЕНИУС;
 третий ряд — А. СПЕНТ-ДЪЕРДИ, Т. УНЕМОТО, Б. ХЕСС



Первый ряд — Р. ХЕНДЕРСОН, Б. ЧАНС, В. А. ЭНГЕЛЬГАРДТ;
 второй ряд — Л. ЭРНСТЕР, А. ЯГЕНДОРФ; третий ряд — «Неизвестный биохимик»
 (фрагмент карикатуры из книги Пильулы «Биоэнергетика»)



Первый ряд — Р. ХЕНДЕРСОН, Б. ЧАНС, В. А. ЭНГЕЛЬГАРТ;
второй ряд — Л. ЭРНСТЕР, А. ЯГЕНДОРФ; третий ряд — «Неизвестный биоэнергетик»
(фрагмент карикатуры из книги Никольса «Биоэнергетика»)

ная величина падения протонного потенциала на молекуле H^+ —АТР-синтазы? Такие вопросы очень трудны из-за сложности профиля мембраны, гетерогенности внутримембранных электрических полей, наличия перемешивающихся слоев вблизи поверхности раздела и т. д. Методы, используемые для определения ΔpH , либо косвенны, либо слишком медленны, либо требуют разрушения природной мембраны с последующей реконструкцией искусственных пузырьков. Неудивительно поэтому, что литература по данной проблеме изобилует противоречивыми сведениями.

Кроме технических трудностей могут быть и определенные объективные причины, затемняющие простейшую ситуацию, когда синтез АТР поддерживается $\Delta \Psi$ и ΔpH , делокализованными соответственно по всей поверхности и по всему объему мембранного пузырька. Например, в митохондриях ионы H^+ , откачиваемые дыхательной цепью из матрикса в узкую щель, образованную складкой внутренней мембраны, могут захватываться H^+ —АТР-синтазой раньше, чем они выйдут из митохондрий, чтобы стать доступными для измерения pH -электродом. В результате ΔpH на H^+ —АТР-синтазе окажется больше, чем ΔpH , измеряемая этим электродом. Гетерогенность $\Delta \Psi$ может быть еще одним источником завышения реально действующей ΔpH против измеряемой (см. [1413] и раздел 5.1.1.9). Все эти локальные эффекты могут быть невелики по абсолютной величине, но тем не менее важны для понимания получаемых результатов, так как скорость фосфорилирования зависит экспоненциально от ΔpH в определенном диапазоне изменения этого параметра [383]. Сказанное означает, что малые изменения ΔpH могут приводить к значительным изменениям синтеза АТР.

Сравнивая возможные функции локальной и делокализованной ΔpH , важно помнить, что последняя оказывается достаточной для синтеза АТР в определенных экспериментальных условиях, а именно при искусственно созданных $\Delta \Psi$ и ΔpH . В природных условиях делокализованная ΔpH абсолютно необходима для действия H^+ —АТР-синтазы.

Следует, однако, отметить, что Уильямс по-прежнему не согласен с подобной трактовкой. Он все еще утверждает, что «демонстрация синтеза АТР в системе, не содержащей замкнутых пузырьков, есть лишь вопрос времени... Когда Эйнштейн сталкивался с опытом, казалось бы, свидетельствовавшим об ошибочности теории относительности, он считал, что, поскольку теория верна, то ошибочен использованный экспериментальный прием» [1603, с. 2].

Окислительное фосфорилирование было открыто более полувека тому назад, а фотофосфорилирование — более 30 лет. На протяжении большей части этого периода биоэнергетики многократно пытались упростить исследуемую систему, заменив замкнутые пузырьки растворами ферментов, олигоферментными ком-

плексами или открытыми мембранными фрагментами. Ни одна из таких попыток не увенчалась успехом. Отрицательные результаты, ошибки и фальсификации — вот печальный итог этого направления исследований. Сейчас нет ни единого наблюдения о синтезе АТФ за счет энергии окисления в открытой системе, которое было бы воспроизведено хотя бы в двух независимых лабораториях. Несколько десятилетий неудач — такого, пожалуй, хватило бы даже Эйнштейну!

По нашему мнению, следует принять как доказанный факт, что замкнутые пузырьки суть неперенный атрибут мембранного фосфорилирования, а локальная $\Delta\bar{p}H$, если и играет какую-то роль, то лишь как фактор, дополнительный к делокализованному протонному потенциалу [1415].

Анализ новейшей истории мембранной биоэнергетики дает множество свидетельств выдающихся успехов, достигнутых в этой области. Так, именно в последнее десятилетие было выяснено, что $\Delta\bar{p}H$ не только интермедиат окислительного фосфорилирования, но и конвертируемая форма энергии в мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий. Было твердо установлено, что $\Delta\bar{p}H$ может использоваться для совершения всех основных типов работы живых систем: химической, осмотической, механической и образования тепла. Выяснилось, что у бактерий, где $\Delta\bar{p}H$ -зависимые процессы особенно многочисленны, существует $\Delta\bar{p}H$ -буфер, роль которого играют градиенты Na^+ и K^+ .

Был описан субъединичный состав большинства генераторов и потребителей $\Delta\bar{p}H$. Для некоторых из них уже определена первичная структура. Первым успехом на этом пути явилось определение аминокислотной последовательности бактериородопсина Ю. А. Овчинниковым и сотр. [103]. Общие контуры его трехмерной структуры были выявлены работами Хендерсона и Ануина [709, 1539]. Быстрые методы регистрации $\Delta\bar{p}H$ позволили проследить за стадиями транслокации протона по молекуле бактериородопсина [497]. Зрительный родопсин оказался первым мембранным белком, ген которого синтезирован химическими методами. Эта работа была выполнена лабораторией Кораны [843].

Для комплекса фотосинтетических реакционных центров из *Rps. viridis* Михелем и соавт. [453] был проведен рентгеноструктурный анализ с атомным разрешением. В самое последнее время той же группой была выяснена первичная структура белковых субъединиц этого комплекса [454, 455]. Нам удалось измерить отдельные стадии переноса зарядов (электрона и протона) в в той же системе [503]. Таким образом, впервые было дано структурное и функциональное описание мембранного преобразователя энергии, так что стал очевиден принцип его действия.

Среди открытий, связанных с механизмом генерации $\Delta\bar{p}H$ в дыхательной цепи, следует сказать о Q-цикле, постулированном Митчелом [1051—1053] и доказанном в общих чертах усилиями

сразу нескольких лабораторий, и выяснение Викстромом [1593, 1595] того обстоятельства, что цитохромоксидаза транспортирует через мембрану два заряда на каждый перенесенный к кислороду электрон.

В работах по H^+ -АТФ-синтазе восторжествовала точка зрения Бойера, согласно которой энергия тратится не на синтез АТФ в каталитическом центре фактора F_1 , а на антипорт АТФ/(ADP + P_i) между каталитическим центром и водной фазой [413].

И уже в самое последнее время произошло событие, заставившее нас отказаться от догмы о монополии H^+ в качестве сопрягающего иона. Был открыт натриевый цикл и доказано, что не только $\Delta\bar{p}H$, но и $\Delta\bar{p}Na$ может играть роль конвертируемой энергетической валюты клетки.

$\Delta\bar{p}H$, $\Delta\bar{p}Na$... Что следующее? Ограничены ли способы полезного использования ионных градиентов теми случаями, которые описаны в нашей книге? И не может ли заряд, движущийся по белковой молекуле в поле напряженностью более 100 кВ/см, сделать нечто нам совсем еще не известное?

Здесь уместно вспомнить, что электрический ток был открыт Гальвани. Так биолог подарил физикам новую главу их науки. Как знать, не ждет ли физиков еще один такой подарок?

**Хронология мембранной биоэнергетики:
важнейшие открытия, предшествовавшие
появлению этой отрасли биологии,
и главные вехи ее развития**

Дата	Открытие	Литературный источник
1930—1932	Окислительное фосфорилирование	[146, 536, 537]
1937—1939	Дыхательный синтез АТФ в бесклеточной системе	[811]
1939	Синтез АТФ, сопряженный с переносом электронов по дыхательной цепи ($P/O > 1$)	[18]
1939	Образование O_2 изолированными хлоропластами	[719]
1941	АТФ как конвертируемая форма энергии в клетке	[949]
1948	Разобщение дыхания и фосфорилирования динитрофенолом	[952]
1948	Редокс-превращение хлорофилла под действием света	[76]
1949	Локализация окислительного фосфорилирования в митохондриях	[836]
1952—1956	Метод дифференциальной спектрофотометрии для изучения дыхательной цепи	[359, 362, 363]
1954	Фотосинтетическое фосфорилирование	[188, 189]
1954—1958	Три пункта энергетического сопряжения в дыхательной цепи	[284, 363, 923, 925, 974, 1425]
1955—1958	Фосфорилирующие субмитохондриальные и суббактериальные пузырьки	[273, 401, 847, 1015, 1646]
1957	Na^+/K^+ -АТРаза	[1391]
1958—1963	Сопрягающие факторы в окислительном фосфорилировании	[1218, 1221, 1222]
1960	Терморегуляторное разобщение	[135]
1961	Обратный перенос электронов в дыхательной цепи	[360, 361, 857]
1961	Хемиосмотическая гипотеза	[1043]
1962	Выделение четырех комплексов ферментов дыхательной цепи	[577, 640, 691, 692, 1647]
1963	Энергозависимая трансгидрогеназа	[424, 425]
1964	Поглощение ионов K^+ митохондриями, вызванное валиномицином	[1071]
1965—1968	Энергозависимое выделение ионов H^+ митохондриями. Детальное изложение хемиосмотической гипотезы	[1046, 1047, 1058]
1966	Синтез АТФ в хлоропластах, поддерживаемый искусственной ΔpH	[766]
1966	Фотосинтетическое образование неорганического пирофосфата	[216]
1966—1967	Повышение валиномицином калиевой проводимости фосфолипидных мицелл и плоских мембран	[77, 367, 1080]
1966—1967	Протонофорная активность разобщителей	[257, 368, 1424]
1967	Синтез АТФ в митохондриях, поддерживаемый искусственной $\Delta \Psi$	[1211]
1968—1969	Электрохромные эффекты как тест на $\Delta \Psi$ в хлоропластах и хроматофорах	[764, 794, 1321]
1969	Метод проникающих синтетических ионов для обнаружения $\Delta \Psi$	[82, 208, 648, 758, 935, 936]
1971	Бактериородопсин	[266, 1126]
1971—1974	$\Delta \bar{p}H$ -генераторы в протеолипосомах	[728, 774, 824, 1229]
1972	H^+ -проводимость через фактор F_0	[1224]
1973	Реконструкция окислительного фосфорилирования в протеолипосомах	[1228]
1973—1977	H^+ -АТРаза во внешней клеточной мембране растений и грибов	[1310, 1369, 1427]
1974	Фотофосфорилирование в протеолипосомах с бактериородопсином и митохондриальной H^+ -АТФ-синтазой и в клетках <i>Halobacterium halobium</i>	[20, 427, 1229]
1974	АТФ-независимое движение бактерий	[908]
1974	Прямое измерение $\Delta \Psi$ в протеолипосомах, сорбированных на клетке	[489]
1975	Гипотеза о Q-цикле	[1051—1053]
1975	«Семиколонная» структура бактериородопсина	[709, 1539]
1975—1978	$\Delta \bar{p}H$ энергизует флагеллярные моторы бактерий	[19, 611, 980, 1398, 1401]
1977—1982	Галородопсин	[906, 998, 1328]
1977—1985	Цитохромоксидаза как H^+ -насос	[1593, 1595]
1978—1979	Первичная структура бактериородопсина	[101, 605, 1147]
1977—1983	H^+ -АТРаза хромоффиновых гранул	[171, 351, 381]
1978—1980	Белок-разобщитель митохондрий бурого жира (термогенин)	[701, 939]
1978—1983	Na^+/K^+ -градиенты как $\Delta \bar{p}H$ -буфер	[310, 1402]
1980	$\Delta \bar{p}H$ -зависимый транспорт ДНК у бактерий	[369]
1980	Na^+ -транспортирующая декарбоксилаза	[467]
1980—1984	Механизм генерации $\Delta \bar{p}H$ $CoQH_2$ -цитохром c-редуктазой	[874, 932, 1522]

Дата	Открытие	Литературный источник
1981—1983	Na ⁺ -мотор бактерий	[376, 729, 730, 853]
1981—1983	H ⁺ —АТРаза тонопласта	[291, 806, 1138]
1982	Синтез связанного АТР изолированным фактором F ₁	[553]
1982	Na ⁺ -транспортирующая дыхательная цепь	[1512]
1982—1986	Протонный кабель: передача энергии вдоль мембран в форме ΔpH	[4, 55, 357]
1984—1985	Первичная структура H ⁺ -АТФ-синтазы	[739, 1568]
1984—1985	Рентгеноструктурный анализ комплекса фотосинтетических реакционных центров	[453—455, 1024, 1025]
1985	«Натриевое» окислительное фосфорилирование, Na ⁺ -цикл	[466, 1417]
1985—1986	Химический синтез генов родопсина и бактериородопсина	[556, 843—845]

Список литературы

1. Абдулаев Н. Г., Набиев И. Р., Ефремов Р. Г., Чуманов Г. Д. Расположение альдимида ретиналя родопсина относительно поверхности фоторецепторного диска // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 26—33.
2. Агуреев А. П., Алтухов Н. Д., Савельев И. А., Мохова Е. Н. Активация внешнего пути окисления NADH в митохондриях при снижении рН // Биохимия. 1981. Т. 46. С. 1945—1956.
3. Алтухов Н. Д., Кириллова Г. П., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. Действие пальмитата на энергетическое сопряжение в митохондриях скелетных мышц и печени // ДАН СССР. 1983. Т. 271. С. 1254—1256.
4. Амченкова А. А., Бакеева Л. Е., Драчев В. А., Зоров Д. В., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. Митохондриальный электрический кабель // Вестн. МГУ. Сер. 16, Биология. 1986. № 3. С. 3—15.
5. Андреев А. Ю., Волков Н. И., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. Карбоксилат препятствует снятию дыхательного контроля пальмитиновой кислотой в митохондриях скелетных мышц // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 474—478.
6. Андреев И. М., Арцатбанов В. Ю., Константинов А. А., Скулачев В. П. Связывание цианида с феррицитохромом a₃ в митохондриях печени крысы // ДАН СССР. 1979. Т. 244. С. 1013—1018.
7. Арчаков А. И. Микросомальные окисления. М.: Наука, 1975. 327 с.
8. Арчаков А. И., Карякин А. В., Скулачев В. П. Перенос электронов между мембранами микросом и митохондрий // ДАН СССР. 1973. Т. 209. С. 221—223.
9. Бабаков А. В., Ермишкин Л. Н., Либерман Е. А. Физические параметры искусственных фосфолипидных мембран и их молекулярная структура // Тез. докл. Всесоюз. конф. молодых биофизиков. М., 1966. С. 16.
10. Баженов Ю. И. Термогенез и мышечная активность при адаптации к холоду. Л.: Наука, 1981. 104 с.
11. Бакеева Л. Е., Драчев В. А., Метлина А. Л., Скулачев В. П., Чумаков К. М. Сходство *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae* и некоторых других вибрионов по строению флаголярного мотора и структуре рибосомальной 5S-RНК // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 8—14.
12. Бакеева Л. Е., Зоров Д. В., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. Мембранный электрический кабель. I. Нитчатые митохондрии фибробластов // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 1130—1136.
13. Бакеева Л. Е., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. Митохондриальный ретикулум: организация и возможные функции новых внутриклеточных структур в мышечной ткани // Вестн. МГУ. Сер. 16, Биология. 1977. Т. 3. С. 23—28.
14. Бакеева Л. Е., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. Образование митохондриального ретикулума в мышце диафрагмы в онтогенезе крысы // Онтогенез. 1982. Т. 13. С. 313—317.
15. Бакеева Л. Е., Шевелев А. А., Ченцов Ю. С., Скулачев В. П. Изучение структуры межмитохондриальных контактов кардиомиоцитов крыс методом замораживания—скальвания // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 133—143.
16. Балашов С. П., Литвин Ф. Ф. Фотохимическое превращение бактериородопсина. М.: Изд-во МГУ, 1985. 163 с.
17. Барский Е. Л., Самуилов В. Д. Абсорбционные сдвиги спектральных форм бактериохлорофилла в хроматофорах *Rhodospirillum rubrum*,

- обусловленные электрохромным эффектом // Биохимия. 1972. Т. 37. С. 1005—1011.
18. Белицер В. Е., Цыбакова Е. Т. О механизме фосфорилирования, сопряженного с дыханием // Там же. 1939. Т. 4. С. 516—621.
 19. Белякова Т. Н., Глаголев А. Н., Скулачев В. П. Электрохимический градиент ионов H^+ — непосредственный источник энергии при движении бактерий // Там же. 1975. Т. 41. С. 1478—1483.
 20. Белякова Т. Н., Кадзаяускас Ю. П., Скулачев В. П., Смирнова И. А., Чекулаева Л. Н., Ясайтис А. А. Генерация электрохимического потенциала ионов H^+ и фотофосфорилирование в клетках *Halobacterium halobium* // ДАН СССР. 1975. Т. 223. С. 483—486.
 21. Бержинскене Я. А., Зизайте Л. Ю., Баронайте З. А., Гринюс Л. Л. Исследование энергообеспечения передачи плазмиды Р 100-1 при конъюгации клеток *Escherichia coli* // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 1103—1112.
 22. Бибиков С. И. Светозависимые изменения концентрации циклического ГМФ у *Halobacterium halobium* // Тез. стенд. сообщ. V Всесоюз. биохим. съезда. Киев, 1986. Т. 3. С. 44.
 23. Бибиков С. И., Скулачев В. П. Два механизма аттрактантного действия света на галобактерии // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 330—331.
 24. Большаков В. И., Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каламжаров Г. Р., Каулен А. Д., Островский М. А., Скулачев В. П. Общность свойств бактериального и зрительного родопсина: превращение энергии света в разность электрических потенциалов // ДАН СССР. 1979. Т. 249. С. 1462—1466.
 25. Большаков В. И., Каламжаров Г. Р., Островский М. А. Фотоиндуцированная генерация потенциала на мембране диска фоторецепторной клетки // Там же. 1978. Т. 241. С. 1241—1244.
 26. Борисова М. П., Бабаков А. В., Коломыткин О. В. Протонная АТРаза в плоском липидном бислое // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 187—190.
 27. Бороваяин В. Л. О некоторых особенностях пурпурных мембран галобактерий и фоторецепторных мембран позвоночных // Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации / Под ред. Р. Р. Иванцко. Пущино: Ин-т биол. физики АН СССР, 1985. С. 89—97.
 28. Броун И. И., Глаголев А. Н., Гринюс Л. Л., Скулачев В. П., Четкаукайте А. В. Na^+/K^+ -градиент как фактор, стабилизирующий энергизованное состояние мембраны // ДАН СССР. 1979. Т. 247. С. 971—974.
 29. Броун И. И., Ким Ю. В. Стабилизация H^+ у *E. coli* при рассеивании трансмембранных градиентов K^+ и Na^+ // Биохимия. 1982. Т. 47. С. 137—144.
 30. Броун И. И., Кирик И. И., Северина И. И., Скулачев В. П. Действие ионов натрия на трансформацию энергии морской цианобактерии *Oscillatoria brevis*: движение трихомов и генерация мембранного потенциала // ДАН СССР. 1986. Т. 293. С. 994—996.
 31. Будкер В. Г., Соколов А. В., Вайнер Л. М., Крайнев А. Г. Транслокация ДНК через модельные фосфолипидные мембраны. I. Механизм транслокации // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 55—66.
 32. Веренинов А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 290 с.
 33. Верховская М. Л., Дибров П. А., Лазарова Р. Л., Скулачев В. П. Na^+ -зависимое окислительное фосфорилирование в клетках *Vibrio alginolyticus* // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 15—23.
 34. Виноградов А. Д. Стационарная кинетика гидролиза и синтеза АТР митохондриальным АТР-синтазным комплексом // XVI конф. ФЕБО. М., 1984. С. 68.
 35. Войников В. К. Регуляция энергетической активности митохондрий высших растений при изменении температуры: физиологические аспекты: Автореф. ... дис. д-ра биол. наук. М., 1986. 38 с.

36. Войников В. К., Лузова Г. Б., Корзун А. М. Влияние холодового шока на количество свободных жирных кислот, энергетическую активность митохондрий и температуру в проростках озимых злаков // ДАН СССР. 1983. Т. 270. С. 761—764.
37. Войников В. К., Лузова Г. Б., Лемзяков В. П. Действие холода на количество свободных жирных кислот и активность митохондрий у озимой ржи // Физиология растений. 1981. Т. 28. С. 18—26.
38. Войццкий В. М., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. Образование разности электрических потенциалов мембранными препаратами бактериородопсина, ассоциированными с поверхностью раздела липид—вода // ДАН СССР. 1979. Т. 245. С. 726—729.
39. Войццкий В. М., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. Фотоэлектрические ответы бактериородопсина в системе липид—вода // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. С. 1184—1195.
40. Вологовский И. Д., Конев С. В. Структурная динамика фоторецепторного аппарата. Минск: Наука и техника, 1986. 208 с.
41. Вторица И. Ю., Курятов А. Б., Киселев А. В., Хорошилова Н. И., Овечкина Г. В., Абдулаев Н. Г., Цетлин В. И., Васильев Р. Г. Иммунохимическое изучение бактериородопсина с помощью моноклональных антител // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 1161—1169.
42. Вульфсон П. Л. Сравнительный биохимический анализ аминокислот и дипептидов в мышечной ткани // Успехи соврем. биологии. 1962. Т. 4. С. 81—92.
43. Выгодина Т. В., Константинов А. А. Два места связывания перекиси водорода с цитохром с-оксидазой — свидетельство в пользу гипотезы «О-цикла» // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 5—11.
44. Гавай В. Л. Рецепция редокс-уровня компонента электрон-транспортной цепи у цианобактерий // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 203—207.
45. Глинский В. П., Самуилов В. Д., Скулачев В. П. Исследование механизма спектральных изменений каротиноидов в хроматофорах *Rhodospirillum rubrum* // Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. С. 664—669.
46. Глинский В. П., Самуилов В. Д., Скулачев В. П. Фотоиндуцированные реакции пигментов несерной пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* в области 400—600 нм // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1973. № 1. С. 93—98.
47. Гринюс Л. Л. Транспорт макромолекул у бактерий. М.: Наука, 1986. 240 с.
48. Гринюс Л. Л., Даугелавичус Р. И., Алкимавичус Г. А. Изучение мембранного потенциала *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* методом проникающих ионов // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 1609—1618.
49. Гринюс Л. Л., Скулачев В. П. Генерация мембранного потенциала, сопряженная с переносом водорода // Там же. 1971. Т. 36. С. 430—434.
50. Дедузова В. И., Кириллова Г. П., Мохова Е. Н., Розовская И. А., Скулачев В. П. Действие менадиона и викасола на энергетику митохондрий при ингибировании начальных участков дыхательной цепи // Там же. 1986. Т. 51. С. 561—573.
51. Демин В. В., Барнаков Л. Н., Джанджугарян К. Н., Василова Л. А. Исследование мембранных белков методом электронно-микроскопической криофрактографии. I. Ультраструктурная организация Na, K—АТРазы в плазматических мембранах и протеолипосомах // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. С. 1783—1789.
52. Дибров П. А., Костырко В. А., Лазарова Р. Л., Скулачев В. П., Смирнова И. А. Роль ионов Na^+ в дыхании, образовании мембранного потенциала и движении морской щелочустойчивой бактерии *Vibrio alginolyticus* // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 15—23.
53. Драчев А. Л., Драчев Л. А., Евстигнеева Р. П., Каулен А. Д., Лазарова Р. Р., Лайхтер А. Л., Мицнер Б. И., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Р. Электрогенные стадии фотопика аналогов

- бактериодопсина, содержащих остатки производных ретиналя // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 1125—1142.
54. Драчев А. Л., Маркин В. С., Скулачев В. П. Концепция ΔpH -буферов: теоретическое обоснование и экспериментальное доказательство буферной роли градиентов Na^+ и K^+ в энергетике бактерий // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 453—477.
 55. Драчев В. А., Зоров Д. Б. Митохондрия как электрический кабель: Экспериментальная проверка гипотезы // ДАН СССР. 1986. Т. 287. С. 1237—1238.
 56. Драчев Л. А., Каминская О. П., Константинов А. А., Котова Е. А., Мамедов М. Д., Самуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. Влияние цитохрома *c*, гексааминоуретина и убикинона-10 на кинетику фотоэлектрических ответов реакционных центров *Rhodospirillum rubrum* // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 1069—1080.
 57. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. Временные характеристики бактериородопсина как молекулярного биологического генератора тока // Молекуляр. биология. 1977. Т. 11. С. 1377—1387.
 58. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. Природа электрогенных фаз фотоцикла бактериородопсина и локализация ретиналя // ДАН СССР. 1985. Т. 281. С. 176—180.
 59. Драчев Л. А., Кондрашин А. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. Обратимая генерация электрического тока реконструированной транс-гидрогеназы // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 1639—1645.
 60. Драчев Л. А., Самуилов В. Д., Северина И. И., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Чекулаева Л. Н. Встраивание протеолипосом и хроматофоров в мембраны на основе фильтров // Биофизика. 1979. Т. 24. С. 1035—1042.
 61. Драчев Л. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. Генерация разности электрических потенциалов хроматофорами *Rhodospirillum rubrum*, индуцируемая лазерной вспышкой // ДАН СССР. 1979. Т. 245. С. 991—994.
 62. Драчева С. М., Драчев Л. А., Цофина А. М. Спектральные сдвиги каротиноидов, индуцируемые липофильными ионами в хроматофорах из *Rhodospseudomonas sphaeroides* // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 1282—1289.
 63. Драчева С. М., Семенов А. Ю., Мамедов М. Д., Минеев А. П., Чаморовский С. К., Гришанова Н. П. Электрогенные стадии при переносе зарядов в электрон-транспортной цепи хроматофоров *Rhodospseudomonas sphaeroides* // Там же. 1986. Т. 3. С. 1011—1019.
 64. Жигачева И. В., Мохова Е. Н., Скулачев В. П. Активация внешнего пути свободного окисления в митохондриях печени при охлаждении крыс // ДАН СССР. 1976. Т. 227. С. 493—496.
 65. Зимкус А. З., Завриев С. К., Гринюс Л. Л. Роль АТФ и мембранного потенциала в процессе проникновения ДНК фага T17 в клетку при инфекции // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. С. 185—191.
 66. Зоров Д. Б., Мохова Е. Н. Действие кратковременного охлаждения на дыхание диафрагмы // Биол. науки. 1973. № 7. С. 45—53.
 67. Ивашкина И. Н., Корниенко И. А., Маслов С. П. К вопросу о возможном участии бурого жира в процессах термогенеза // Тез. докл. V Всесоюз. конф. по экол. физиологии. Л., 1977. С. 162—163.
 68. Кагава Я. Биомембраны. М.: Высш. шк., 1985. 303 с.
 69. Каласаускайте Е. В., Армалите В. К., Гринюс Л. Л. Роль протон-движущей силы в инфекции T4 бактериофагом клеток *Escherichia coli* K-12 // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 221—232.
 70. Каминская О. П., Драчев Л. А., Константинов А. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. Электрогенное восстановление вторичного хинонного акцептора в хроматофорах *Rhodospirillum rubrum* // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 557—562.

71. Карагулян А. К. Исследование кинетики образования разности потенциалов на мембранах фотосинтезирующих организмов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ереван, 1984. 22 с.
72. Клейтон Р. Фотосинтез: Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984. 350 с.
73. Кондрашин А. А., Ременников В. Г., Самуилов В. Д., Скулачев В. П. Реконструкция электрогенной функции изолированной мембранной пиррофосфатазы *Rhodospirillum rubrum* // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 2403—2406.
74. Константинов А. А. Перенос электронов и трансформация энергии в цитохромной цепи митохондрий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1985. 22 с.
75. Котельникова А. В., Звягильская Р. А. Биохимия дрожжевых митохондрий. М.: Наука, 1973. 240 с.
76. Красновский А. А. Обратимое фотохимическое восстановление хлорофилла аскорбиновой кислотой // ДАН СССР. 1948. Т. 60. С. 421—424.
- 76а. Красновский А. А. (мл.), Венедиктов Е. А., Черненко О. В. Тушение синглетного кислорода хлорофиллами и порфиринами // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 966—972.
77. Лев А. А., Бужинский Е. П. Катионная специфичность модельных бимолекулярных фосфолипидных мембран с введенным в них валиномином // Цитология. 1967. Т. 9. С. 102—106.
78. Левачев М. М., Мишукова Е. А., Сивкова В. Г., Скулачев В. П. Энергетический обмен голубя при самосогревании после гипотермии // Биохимия. 1975. Т. 30. С. 864—874.
79. Левин С. А., Потапова Т. В., Скулачев В. П., Чайлахян Л. М. Распространяющиеся изменения электрического потенциала у нитчатых цианобактерий // Биофизика. 1982. Т. 27. С. 280—283.
80. Левицкий Д. О., Скулачев В. П. Действие проникающих синтетических ионов на дыхание митохондрий и субмитохондриальных частиц // Молекуляр. биология. 1982. Т. 6. С. 338—345.
81. Либерман Е. А. Биофизика клетки: Молекулярная вычислительная машина клетки (МВМ) VIII. Возможная конструкция молекулярной памяти в биологических мембранах и принцип минимальных затрат свободной энергии на запись информации // Биофизика. 1975. Т. 20. С. 624—627.
82. Либерман Е. А., Топалы В. П., Цофина Л. М., Ясайтис А. А., Скулачев В. П. Транспорт ионов и электрический потенциал митохондриальных мембран // Биохимия. 1969. Т. 34. С. 1083—1087.
83. Либерман Е. А., Цофина Л. М. Активный транспорт проникающих анионов фрагментами митохондрий и фотофосфорилирующих бактерий // Биофизика. 1969. Т. 14. С. 1017—1025.
84. Личко Л. П., Окорков Л. А. H^+ -АТРаза вакуолей дрожжей состоит из нескольких субъединиц и не образует фосфорилированный интермедиат // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 770—775.
85. Мансурова С. Э. Неорганический пирофосфат: энергозависимый синтез и использование в реакциях фосфорилирования // Успехи микробиологии. 1982. Т. 17. С. 3—29.
86. Марголис Л. Б., Розовская И. А., Скулачев В. П. Нигерицин как фактор, снижающий внутриклеточный pH и угнетающий синтез ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 1148—1151.
87. Маркин В. С., Скулачев В. П. Математическое моделирование двух путей восприятия света фоторецепторной клеткой // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 167—176.
88. Маслов С. П., Ивашкина И. Н. Исследование соотношения свободного и фосфорилирующего дыхания *in vivo* с помощью амитала // Вопр. мед. химии. 1964. Т. 10. С. 24—27.

89. Матвеев Ю. А., Чекалин С. А., Ярцев А. А. Фемтосекундная спектроскопия первичных фотопроточесов в модифицированных РЦ *Rhodospseudomonas sphaeroides* // ДАН СССР. 1986. Т. 292. С. 724—728.
90. Машанский В. Ф., Озирская Е. В., Туманова Н. Л., Дроздов А. Л. Межмитохондриальные контакты в нейронах переднего мозга ящерицы *Orphisaurus apodus* // Цитология. 1984. Т. 26. С. 740—745.
- 90а. Мейсель М. Н., Бирюзова В. И., Волкова Т. М., Малатян М. Н., Медведова Г. А. Функциональная морфология и цитохимия митохондриального аппарата микроорганизмов // Электронная и флюоресцентная микроскопия клетки / Под ред. Е. Н. Хейсина. М.; Л.: Наука, 1964. С. 3—15.
91. Милейковская Е. И., Абуладзе А. П., Кормер С. С., Нечаев Л. И., Островский Д. Н. Особенности механизма функционирования H^+ -АТФазы из мембран анаэробной бактерии *Lactobacillus casei*: Новые представления о механизме функционирования H^+ -АТФаз // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 1199—1206.
92. Мильгром Я. М., Мураталиев М. Б. Митохондриальная F_1 -АТФаза. Изменение P_i -связывающих свойств и каталитической активности обусловлены процессом перераспределения АРР между нуклеотидсвязывающими центрами, включающими стадии освобождения нуклеотида и его повторного связывания // Там же. 1986. Т. 3. С. 781—791.
93. Модянов Н. Н., Арзамасова Н. М., Аристархова Е. А., Геводян Н. М., Овчинников Ю. А. Совпадающие элементы структур ионотранспортирующих АТФаз, выявленные при анализе аминокислотной последовательности Na^+ , K^+ -АТФазы // Там же. 1985. Т. 2. С. 844—848.
94. Мохова Е. Н., Зоров Д. Б. Влияние охлаждения адаптированных к холоду крыс на дыхание диафрагмы // Терморегуляция: Адаптация к холоду. Новосибирск: Ин-т физиол. СО АН СССР, 1970. С. 217—224.
95. Мурванидзе Г. В., Северина И. И., Скулачев В. П. Этилодами: проникающий катон и прижизненный индикатор мембранного потенциала цианобактерий // ДАН СССР. 1981. Т. 261. С. 1252—1254.
96. Набиев Т. Р., Ефремов Р. Г., Чуманов Г. Д., Курятов А. Б. Расположение альбидина ретины относительно поверхности пурпурной мембраны: Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 1003—1015.
97. Нейфах Е. А. Торможение имидазолсодержащими соединениями перекисного окисления эндогенных ненасыщенных жирных кислот в мышцах // ДАН СССР. 1966. Т. 170. С. 1216—1219.
98. Никольс Д. Дж. Биоэнергетика: Введение в хемиосмотическую теорию. М.: Мир. 1985. 190 с.
99. Новикова Н. И., Метлина А. Л., Зарубина А. П., Поглазов Б. Ф. Изучение структуры базальных тел жгутиков // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 103—107.
100. Овчинников Ю. А., Абдулаев П. Г., Киселев А. В., Набиев И. Р., Васильева Х. В., Ефремов Р. Г. Остаток тирозина катализирует светиндуцированное депротонирование альбидина ретины в бактериородопсине // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 325—338.
101. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Богачук А. С., Золотарев А. С., Еганян Е. Р., Костецкий П. В. Зрительный родопсин. III. Полная аминокислотная последовательность и топография в мембране // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. С. 1331—1340.
102. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Артамонов И. Д., Золотарев А. С. Полная аминокислотная последовательность зрительного родопсина // Там же. 1982. Т. 8. С. 1424—1427.
103. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Фейгина М. Ю., Лобанов Н. А., Киселев А. В., Назимов И. А. Первичная структура бактериородопсина // Там же. 1978. Т. 4. С. 1573—1574.

104. Овчинников Ю. А., Арсенян Ф. Г., Броуде Н. Г., Петрухин К. Е., Гришин Е. В., Алданова Н. А., Арзамасова Н. М., Аристархова Е. Н., Мелков А. М., Смирнов Ю. Г., Гурьев Ф. О., Монастырская Г. Ф., Модянов Н. Н. Нуклеотидная последовательность кДНК и первичная структура α -субъединицы Na , K -АТФазы почек свиньи // ДАН СССР. 1985. Т. 285. С. 1490—1495.
105. Овчинников Ю. А., Броуде Н. Г., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Кияшин Н. И., Арзамасова Н. М., Гемондян Н. Н., Чертова Е. Н., Мелков Е. А., Смирнов Ю. Г., Монастырская Г. Ф., Модянов Н. Н. Нуклеотидная последовательность кДНК и первичная структура β -субъединицы Na , K -АТФазы почек свиньи // Там же. 1986. Т. 287. С. 1491—1496.
106. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембраноактивные комплексы. М.: Наука, 1974. 462 с.
107. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. Ф., Арсенян Ф. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арзамасова Н. М., Северцев И. В., Модянов Н. Н. Аминокислотная последовательность 17 кДа фрагмента цитоплазматической области α -субъединицы Na , K -АТФазы // ДАН СССР. 1985. Т. 283. С. 1278—1280.
108. Паладина Т. А. Транспортные H^+ -АТФазы несопрягающих мембран // Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 96. С. 394—408.
109. Паладина Т. А. H^+ -аденозинтрифосфатазы плазматических мембран // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. С. 63—74.
110. Панов А. В. Регуляция энергетического обмена на уровне митохондриального переносчика адениннуклеотидов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Ташкент, 1984. 46 с.
111. Панцхава Е. С., Березин И. В., Техническая биоэнергетика. I. Биомасса как дополнительный источник топлива. Получение биогаза // Биотехнология. 1986. № 2. С. 1—12.
112. Поглазов Б. Ф., Метлина А. Л., Новиков В. В., Современные представления о механизме движения бактерий // Изв. АН СССР. 1981. Т. 5. С. 672—689.
113. Поннамперума С. Небиологический синтез некоторых компонентов нуклеиновых кислот // Происхождение предбиологических систем / Под ред. А. И. Опарина. М.: Мир, 1966. С. 224—238.
114. Рууге Э. К., Константинов А. А. Сигнал ЭПР семихинона Q_{10} с необычными релаксационными параметрами // Биофизика. 1976. Т. 21. С. 586—588.
115. Северин С. Е., Болдырев А. А., Дупин А. М. Биологическая роль гистидиновых дипептидов в возбудимых тканях // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30. С. 32—36.
116. Северин С. Е., Кирзон М. В., Кафтанова Т. М. Влияние карнозина и ансерина на работу изолированной мышцы лягушки // ДАН СССР. 1953. Т. 91. С. 691—701.
117. Северин С. Е., Скулачев В. П., Ягужинский Л. С. Возможная роль карнитина в транспорте жирных кислот через митохондриальную мембрану // Биохимия. 1970. Т. 35. С. 1250—1257.
118. Северин С. Е., Ян Фу Юй. Окислительное фосфорилирование при тиреотоксикозе // Там же. 1960. Т. 25. С. 855—864.
119. Северина И. И. О способе ассоциации протеолипосом с плоской бислойной фосфолипидной мембраной // Там же. 1983. Т. 48. С. 1522—1529.
120. Сент-Дьерди А. Биоэнергетика. М.: Физматгиздат, 1960. 155 с.
121. Скулачев В. П. Новое в изучении окислительного фосфорилирования на митохондриях // Успехи соврем. биологии. 1958. Т. 46. С. 241—263.
122. Скулачев В. П. Фосфорилирование в дыхательной цепи // Фосфорилирование и функция. Л.: ИЭМ, 1960. С. 33—43.
123. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 156 с.

124. Скулачев В. П. О регуляции сопряженности окисления и фосфорилирования // Междунар. биохим. конгр. V симпоз. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 382—390.
125. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука, 1969. 439 с.
126. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М.: Наука, 1972. 203 с.
127. Скулачев В. П. Аденозинтрифосфат и трансмембранный потенциал понов водорода — две конвертируемые транспортные формы энергии в живой клетке // Успехи соврем. биологии. 1977. Т. 84. С. 165—175.
128. Скулачев В. П. Гипотеза о биологической функции Na^+/K^+ -градиента как резервной форме энергии // Там же. 1978. Т. 88. С. 163—180.
129. Скулачев В. П. Мембранное электричество и энергетика живой клетки // Современные проблемы физики твердого тела и биофизики / Под ред. В. Г. Барьяхтара. Киев.: Наук. думка, 1982. С. 180—202.
130. Скулачев В. П. О полифункциональности зрительного родопсина // Успехи соврем. биологии. 1982. Т. 94. С. 331—344.
131. Скулачев В. П. Натриевый цикл — новый тип бактериальной энергетики // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 179—183.
132. Скулачев В. П. Натриевая энергетика живых систем // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 5—25.
133. Скулачев В. П. Трехзвенная дыхательная цепь // Биохимия. 1986. Т. 51. С. 1925—1929.
134. Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М.: Наука, 1977. 93 с.
135. Скулачев В. П., Маслов С. П. Роль нефосфорилирующего окисления в терморегуляции // Биохимия. 1960. Т. 25. С. 1058—1064.
136. Скулачев В. П., Маслов С. П., Сивкова В. Г., Калинин Л. П., Маслова Г. М. Холодовое разобщение окисления и фосфорилирования в мышцах белых мышей // Там же. 1963. Т. 28. С. 70—79.
137. Смирнова И. А., Константинова А. А., Скулачев В. П. Прямое измерение генерации мембранного потенциала субмитохондриальными частями // ДАН СССР. 1978. Т. 241. С. 970—973.
138. Спирин А. С. Структура рибосом и биосинтез белка. Пущино: Ин-т белка АН СССР, 1984. 367 с.
139. Тихонова Г. В. Исследование систем переноса электронов железокисляющих бактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1967. 19 с.
140. Тихонова Г. В., Бикетов С. Ф., Кашо В. Н., Козлов И. А., Милейковская Е. И., Островский Д. Н., Симакова И. М., Скулачев В. П. Особенности субъединичного состава H^+ -АТФазы из анаэробной бактерии *Lactobacillus casei* // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 1560—1567.
141. Тихонова Г. В., Лисенкова Л. Л., Доман Н. Г., Скулачев В. П. Пути переноса электронов у железокисляющих бактерий *Thiobacillus ferrooxidans* // Биохимия. 1977. Т. 32. С. 725—729.
142. Хесин Р. Б. Биохимия цитоплазмы. М.: Изд-во АН СССР, 1960. 289 с.
143. Шабалин А. Л., Зеликина И. И. Гигантские митохондрии и их «Омега»-формы в нейронах при адаптации млекопитающих к зимней спячке // ДАН СССР. 1975. Т. 220. С. 465—468.
144. Шерман М. Ю. Рецепция H^+ и взаимодействие регуляторных систем у бактерий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1983. 23 с.
145. Шерман М. Ю., Воробьева Н. В. Участие системы хемотаксиса в регуляции клеточного деления у *Escherichia coli* // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 419—422.
146. Энгельгардт В. А. Анаэробный распад и аэробный ресинтез пироглютата в красных кровяных клетках птиц // Казан. мед. журн. 1931. Т. 27. С. 496—504.

147. Abdulaev N. G., Artamonov P. D., Bogachuk A. S., Feigina M. Yu., Kostina M. B., Kudelin A. B., Martynov V. I., Miroshnikov A. I., Zolotarev A. S., Ovchinnikov Yu. A. Structure of light-activated proteins: visual rhodopsin // Biochem. Intern. 1982. Vol. 5. P. 693—703.
148. Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Ovchinnikov Yu. A., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. Products of limited proteolysis of bacteriorhodopsin generate a membrane potential // FEBS Lett. 1978. Vol. 90. P. 190—194.
149. Ablyayeva N. Kh., Kirillova G. P., Mokhova E. N. Fast cold-induced activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of hyperthyroid rats // Biochim. et. biophys. acta. 1985. Vol. 806. P. 75—80.
150. Abrams A., Jensen C. Altered expression of the H^+ -ATPase in *Streptococcus faecalis* membranes // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 122. P. 151—157.
151. Adler J. Chemotaxis in bacteria // Annu. Rev. Biochem. 1975. Vol. 44. P. 341—356.
152. Adrian G. S., McCammon M. T., Montgomery D. L., Douglas M. G. Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane // Mol. a. Cell. Biol. 1986. Vol. 6. P. 626—634.
153. Afong M., Olynyk K. A., Patel H. V., Arnold J., Liao S.-K., Freeman K. B. Immunological studies of the uncoupling protein of brown adipose tissue // Canad. J. Biochem. a. Cell Biol. 1985. Vol. 63. P. 96—101.
154. Aizawa S.-I., Dean G. E., Jones C. J., Macnab R. M., Yamaguchi S. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 161. P. 836—849.
155. Al-Mahrouq H. A., Carper S. W., Lancaster J. R. Discrimination between transmembrane ion gradient-driven and electron transfer-driven ATP synthesis in the methanogenic bacteria // FEBS Lett. 1986. Vol. 207. P. 262—265.
156. Albracht S. P. J., Van Verseveld H. W., Hagen R., Kalkman M. L. A comparison of the respiratory chain in particles from *Paracoccus denitrificans* and bovine heart mitochondria by EPR spectroscopy // Biochim. et. biophys. acta. 1980. Vol. 593. P. 173—186.
157. Aleem M. I. H. Generation of reducing power in chemosynthesis. II. Energy-linked reduction of pyridine nucleotide in the chemototroph *Nitrosomonas europaea* // Ibid. 1966. Vol. 113. P. 216—224.
158. Aleem M. I. H. Generation of reducing power in chemosynthesis. III. Energy-linked reduction of pyrimidine nucleotides in *Thiobacillus novellus* // J. Bacteriol. 1966. Vol. 91. P. 729—736.
159. Alfred D. R., Staehelin L. A. Lateral distribution of the cytochrome b_6/f and coupling factor ATP synthetase complexes of chloroplast thylakoid membranes // Plant Physiol. 1985. Vol. 78. P. 199—202.
160. Almers W., Stirling C. Distribution of transport proteins over animal cell membranes // J. Membrane Biol. 1984. Vol. 77. P. 169—186.
161. Alt J., Morris J., Westhoff P., Herrmann R. G. Nucleotide sequence of the clustered genes for the 44 kDa chlorophyll apoprotein and the «32 kDa»-like protein of the photosystem II reaction center in the spinach plastid chromosome // Curr. Genet. 1984. Vol. 8. P. 597—606.
162. Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M. Proton gradient linkage to active uptake of $[^3\text{H}]$ acetylcholine by Torpedo electric organ synaptic vesicles // Biochemistry. 1982. Vol. 21. P. 3037—3043.
163. Anderson S., Bankier B. G., De Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drown J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G. Sequence and organiza-

- tion of the human mitochondrial genome // *Nature*. 1981. Vol. 250. P. 457—465.
164. Anderson S., De Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Eperon I. C., Young I. G. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 156. P. 683—717.
 165. Anderson W. M., Fisher R. R. The subunit structure of bovine heart mitochondrial transhydrogenase // *Biochim. et biophys. acta*. 1981. Vol. 635. P. 194—199.
 166. Angelides K. Transport of catecholamines by native and reconstituted rat heart synaptic vesicles // *J. Neurochem.* 1980. Vol. 35. P. 949—962.
 167. Anraku Y. Molecular organization and physiological functions of bacterial amino acid transport systems // *Transport and bioenergetics in biomembranes* / Ed. R. Sato, Y. Kagawa. Tokyo: Jap. Sci. Soc. press. 1982. P. 87—109.
 168. Aoki M., Katoh S. Size of the plastoquinone pool functioning in photosynthetic and respiratory electron transport of *Synechococcus* sp // *Planta a Cell Physiol.* 1983. Vol. 24. P. 1379—1386.
 169. Applebury M. L., Peters K. S., Rentzepis P. M. Primary intermediates in the photochemical cycle of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* 1978. Vol. 23. P. 375—382.
 170. Appleby C. A., Morton R. K. Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast: purification and crystallization // *Biochem. J.* 1959. Vol. 71. P. 492—499.
 171. Apps D. K., Pryde J. G., Sutton R. The H^+ —translocating adenosine triphosphatase of chromaffin granule membranes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982. Vol. 402. P. 134—145.
 172. Apps D. K., Pryde J. G., Sutton R., Phillips J. H. Inhibition of adenosine triphosphatase, 5-hydroxytryptamine transport and proton-translocation activities of resealed chromaffin granule ghosts // *Biochem. J.* 1980. Vol. 190. P. 273—282.
 173. Apps D. K., Schatz G. An adenosine triphosphatase isolated from chromaffin granule membranes is closely similar to F_1 -adenosine triphosphate of mitochondria // *Europ. J. Biochem.* 1979. Vol. 100. P. 441—449.
 174. Aprilla J. R., Asimakis G. K. Reye's syndrome: the effect of patient serum on mitochondrial respiration in vitro // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1977. Vol. 79. P. 1122—1129.
 175. Aprilla J. R., Austin J. Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1981. Vol. 212. P. 689—699.
 176. Aquila H., Link T. A., Klingenberg M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane // *EMBO J.* 1985. Vol. 4. P. 2369—2376.
 177. Aquila H., Misra D., Eulitz M., Klingenberg M. Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria // *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.* 1982. Vol. 363. P. 345—349.
 178. Arai M., Gordon E. R., Lieber C. S. Decreased cytochrome oxidase activity in hepatic mitochondria after chronic ethanol consumption and the possible role of decreased cytochrome aa_3 content and changes in phospholipids // *Biochim. et biophys. acta*. 1982. Vol. 797. P. 320—327.
 179. Archakov A. I., Karyakin A. V., Skulachev V. P. Intermembrane electron transfer in mitochondrial and microsomal systems // *FEBS Lett.* 1974. Vol. 39. P. 239—242.
 180. Archakov A. I., Karyakin A. V., Skulachev V. P. A hypothesis on membranous proteins specialized in lateral transport // *Ibid.* 1975. Vol. 60. P. 244—246.
 181. Archakov A. I., Karyakin A. V., Skulachev V. P. Intermembrane electron transfer in the absence of added watersoluble carriers // *Biochim. et biophys. acta*. 1975. Vol. 408. P. 93—100.

182. Argov Z., Bank W. J., Maris J., Eleff S., Kennaway N. G., Olson R. E., Chance B. Treatment of mitochondrial myopathy due to complex III, deficiency with vitamins K_3 and C: $A[^{31}P]$ —NMR follow-up study // *Ann. Neurol.* 1986. Vol. 19. P. 598—602.
183. Aris J. P., Klionsky D. J., Simoni R. D. The F_0 subunit of the *Escherichia coli* F_0F_1 —ATP synthase are sufficient to form a functional proton pore // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 11207—11215.
184. Aris J. P., Simoni R. D. Cross-linking and labeling of the *Escherichia coli* F_1F_0 —ATP synthase reveal a compact hydrophilic portion of F_0 close to an F_1 catalytic subunit // *Ibid.* 1983. Vol. 258. P. 14599—14609.
185. Armitage J. P., Ingham G., Evans M. C. W. Role of proton motive force in phototactic and aerotactic responses of *Rhodospseudomonas sphaeroides* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 967—972.
186. Arnold C. G., Schimmer O., Schotz F., Bathald H. Die Mitochondrien von *Chlamydomonas reinhardtii* // *Arch. Mikrobiol.* 1972. Bd. 81. S. 50—67.
187. Arnon D. I. The discovery of photosynthetic phosphorylation // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. P. 258—262.
188. Arnon D. I., Allen M. B., Whatley F. R. Photosynthesis by isolated chloroplasts // *Nature*. 1954. Vol. 174. P. 394—396.
189. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B. Photosynthesis by isolated chloroplasts. II. Photosynthetic phosphorylation: the conversion of light into phosphate bond energy // *J. Amer. Chem. Soc.* 1974. Vol. 76. P. 6324—6329.
190. Aronson P. S. Pathways for solute transport coupled to H^+ , OH^- , or HCO_3^- gradients in renal microvillus membrane vesicles // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.: Plenum press. 1982. Vol. 2. P. 225—230.
191. Arshavsky V. Yu., Baryshev V. A., Brown I. I., Glagolev A. N., Skulachev V. P. Transmembrane gradient of K^+ and Na^+ ions as an energy buffer in *Halobacterium halobium* cells // *FEBS Lett.* 1981. Vol. 133. P. 22—26.
192. Arslan P., Corps A. N., Hesketh T. R., Metcalfe J. C., Pozzan T. Cis-unsaturated fatty acids uncouple mitochondria and stimulate glycolysis in intact lymphocytes // *Biochem. J.* 1984. Vol. 217. P. 419—425.
193. Artzhatbanov V. Yu., Konstantinov A. A., Skulachev V. P. Involvement of intramitochondrial proton in redox reactions of cytochrome a // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 87. P. 180—185.
194. Asano M., Hayashi M., Unemoto T., Tokuda H. Ag^+ -sensitive NADH dehydrogenase in the Na^+ -motive respiratory chain of the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // *Agr. a. Biol. Chem.* 1985. Vol. 49. P. 2813—2817.
195. Asimakis G. K., Aprilla J. R. Net uptake of adenine nucleotides in isolated rat liver mitochondria // *FEBS Lett.* 1980. Vol. 117. P. 157—160.
196. Atkinson A. W., John P. C. L., Gunning B. E. S. The growth and division of the single mitochondrion and other organelles during the cell cycle of *Chlorella* studied by quantitative stereology and three dimensional reconstruction // *Protoplasma*. 1974. Vol. 81. P. 77—109.
197. Auffret C. A., Hanke D. E. Improved preparation and assay and some characteristics of Cl^- —ATPase activity from *Limonium vulgare* // *Biochim. et biophys. acta*. 1981. Vol. 648. P. 186—191.
198. Axelrod D. Lateral motion of membrane proteins and biological function // *J. Membrane Biol.* 1983. Vol. 75. P. 1—10.
199. Azzone G. F., Massari S., Pozzan T. Mechanism of active shrinkage in mitochondria. I. Coupling between weak electrolyte fluxes // *Biochim. et biophys. acta*. 1976. Vol. 423. P. 15—26.

200. *Babcock G. T., Ghanotakis D. F., Ke B., Diner B. A.* Electron donation to photosystem II in reaction center preparations // *Ibid.* 1983. Vol. 723. P. 276—286.
201. *Bacetti B., Afzelius B. A.* The biology of the sperm cell: monographs in developmental biology. Basel: Acad. Press, 1976. 254 p.
202. *Bagley K., Dollinger G., Eisenstein L., Singh A. K., Limanyi L.* Fourier transform infrared difference spectroscopy of bacteriorhodopsin and its photoproducts // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 4972—4976.
203. *Bahr-Lindström H., Galante Y. M., Persson M., Jorvall H.* The primary structure of subunit II of NADH-dehydrogenase from bovine heart mitochondria // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 134. P. 145—150.
204. *Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Skulachev V. P.* Mitochondrial framework (Reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle // *Biochim. et biophys. acta.* 1978. Vol. 501. P. 349—369.
205. *Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Skulachev V. P.* Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle // *Europ. J. Cell Biol.* 1981. Vol. 25. P. 175—181.
206. *Bakeeva L. E., Chentsov Yu. S., Skulachev V. P.* Intermitochondrial contacts in myocardiocytes // *J. Mol. a. Cell. Cardiol.* 1983. Vol. 15. P. 413—420.
207. *Bakeeva L. E., Chumakov K. M., Drachev A. L., Metlina A. L., Skulachev V. P.* The sodium cycle. III. *Vibrio alginolyticus* resembles *V. cholerae* and some other vibrios by flagellar motor and ribosomal 5S-RNA structures // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 850. P. 466—472.
208. *Bakeeva L. E., Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kuliene V. V., Levitsky D. O., Liberman E. A., Severina I. I., Skulachev V. P.* Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria // *Ibid.* 1970. Vol. 216. P. 13—21.
209. *Bakker E. P.* The *Escherichia coli* TrkA K^+ transport system is a secondary K^+ — H^+ symporter // *J. Supramol. Struct. suppl.* 1980. Vol. 4. P. 80.
210. *Bakker E. P.* The role of ATP and the proton-motive force in potassium transport by the *Escherichia coli* TrkA system // *Vectorial reactions in electron and ion transport in mitochondria and bacteria* / Ed. F. Palmieri et al. Amsterdam etc.: Elsevier, 1981. P. 315—348.
211. *Bakker E. P., Harold F. M.* Energy coupling to potassium transport in *Streptococcus faecalis* // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255. P. 433—440.
212. *Bakker E. P., Randall L. L.* The requirements of energy during export of α -lactamase in *Escherichia coli* is full-filled by the total protonmotive force // *EMBO J.* 1984. Vol. 3. P. 895—901.
213. *Bakker R., Dobbeltmann J., Borst-Pauwels G. W. F. H.* Membrane potential in the yeast *Endomyces magnusii* measured by microelectrodes and TPP⁺ distribution // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 861. P. 205—209.
214. *Balogh-Nair V., Nakanishi K.* Synthetic analogs of retinal, bacteriorhodopsin and bovine rhodopsin // *Meth. Enzymol.* 1980. Vol. 88. P. 496—506.
215. *Baltscheffsky M.* Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1969. Vol. 130. P. 646—652.
216. *Baltscheffsky M., Stedingk L.-V. von, Heldt H. W., Klingenberg M.* Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation // *Science.* 1966. Vol. 153. P. 1120—1124.
217. *Bamberg E., Hegemann P., Oesterhelt D.* The chromoprotein of halorhodopsin is the light-driven electrogenic chloride pumps in *Halobacterium halobium* // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 6216—6221.
218. *Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.* Diffusion of univalent

- ions across the lamellae of swollen phospholipids // *J. Mol. Biol.* 1965. Vol. 13. P. 238—252.
219. *Bar-Zvi D., Yoshida M., Shavit N.* Reconstitution of photophosphorylation with coupling factor 1 ATPases from the thermophilic bacterium PS3 and lettuce chloroplasts // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 806. P. 341—347.
220. *Barany M., Barany K.* Phosphorylation of the myofibrillar proteins // *Annu. Rev. Physiol.* 1980. Vol. 42. P. 275—292.
221. *Barr R., Saffranski K., Sun I. L., Crane F. L., Morre D. J.* An electrogenic proton pump associated with the Golgi apparatus of mouse liver driven by NADH and ATP // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 14064—14067.
222. *Barr R., Sandelius A. S., Crane F. L., Moore D. L.* Oxidation of reduced pyridine nucleotides by plasma membranes of soy-bean hypocotyl // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1985. Vol. 131. P. 943—948.
223. *Barre H., Cohen-Adad F., Duchamp C., Rouanet J.-L.* Multilocular adipocytes from muscovy ducklings — differentiated in response to cold acclimation // *J. Physiol.* 1986. Vol. 375. P. 27—38.
224. *Barre H., Nedergaard J., Cannon B.* Increased respiration in skeletal muscle mitochondria from cold-acclimated ducklings; uncoupling effects of free fatty acids // *Comp. Biochem. a. Physiol. B.* 1986. Vol. 85. P. 343—348.
225. *Barsky E. L., Bonch-Osmolovskaya E. A., Ostroumov S. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P.* A study of the membrane potential and pH gradient in chromatophores and intact cells of photosynthetic bacteria // *Biochim. et biophys. acta.* 1975. Vol. 387. P. 388—395.
226. *Barsky E. L., Dancshary Z., Drachev L. A., Il'ina M. D., Jasaitis A. A., Kondrashin A. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P.* The reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriochlorophyll and chlorophyll complexes // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 7066—7071.
227. *Barts P. W. J. A., Hoerichs J. A., Klaassen A., Borst-Pauwels G. W. F. H.* Uptake of the lipophilic cation dibenzylidimethyl ammonium into *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. et Biophys. acta.* 1980. Vol. 597. P. 125—136.
228. *Baryshev V. A., Glagolev A. N., Skulachev V. P.* Sensing of $\Delta\bar{H}^+$ in phototaxis of *Halobacterium halobium* // *Nature.* 1981. Vol. 292. P. 338—340.
229. *Bashford C. L., Thayer W. S.* Thermodynamics of the electrochemical proton gradient in bovine heart submitochondrial particles // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252. P. 8459—8463.
230. *Bassilana M., Diamino-Forano E., Leblanc G.* Effect of membrane potential on the kinetics parameters of the Na^+ or H^+ meliobiose symport in *Escherichia coli* membrane vesicles // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1985. Vol. 129. P. 626—631.
231. *Bataynen N., Kopacz S. J., Lee C.-P.* The modes of action of long chain alkyl compounds on the respiratory chain-linked energy transducing system in submitochondrial particles // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1986. Vol. 250. P. 476—487.
232. *Bate Smith E. C.* The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine // *J. Physiol.* 1938. Vol. 92. P. 336—343.
233. *Beattie D. S., Clejan L., Bosch C. G.* Further studies on the binding of DCCD to cytochrome *b* and subunit VIII of complex III isolated from beef heart mitochondria // *J. Bioenerg. a. Biomembrane.* 1985. Vol. 17. P. 251—273.
234. *Becker D. W., Brand J. J.* *Anacystis nidulans* demonstrates a photosystem II cation requirement satisfied only by Ca^{2+} or Na^+ // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 79. P. 552—558.

235. Beech P. L., Wethebree R. Serial reconstitution of the mitochondrial reticulum in the Coccolithophorid, *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyceae) // *Protoplasma*. 1984. Vol. 123. P. 226—229.
236. Beechey R. B., Robertson A. M., Holloway C. T., Knight I. G. Effect of dicyclohexylcarbodiimide on reactions involved in respiratory chain phosphorylation // *Biochemistry*. 1967. Vol. 6. P. 3867—3879.
237. Beeler T. J., Wang T., Gable K., Lee S. Comparison of the rat microsomal Mg-ATPase of various tissues // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1985. Vol. 243. P. 644—654.
238. Bellnier D. A., Prout G. R., Lin C.-W. Effect of 514,5-nm argon ion laser radiation on hematoporphyrin derivative-treated bladder tumor cells in vitro and in vivo // *J. Nat. Cancer Inst.* 1985. Vol. 74. P. 617—625.
239. Bennett N. Optical study of the light-induced protonation changes associated with the metarhodopsin II intermediate in rod-outer-segment membranes // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 111. P. 99—103.
240. Bennett N., Michel-Villaz M., Dupont Y. Cyanine dye measurement of a light-induced membrane potential associated with the metarhodopsin II intermediate in rod-outer-segment membranes // *Ibid.* 1980. Vol. 111. P. 105—110.
241. Benyoucef M., Rigaud J.-L., Leblanc G. Cation transport mechanisms in *Mycoplasma mycoides* var. *Capri* cells: Na⁺-dependent K⁺-accumulation // *Biochem. J.* 1982. Vol. 208. P. 529—538.
242. Benyoucef M., Rigaud J.-L., Leblanc G. Cation transport mechanisms in *Mycoplasma mycoides* var. *Capri* cells: The nature of the link between K⁺ and Na⁺ transport // *Ibid.* 1982. Vol. 208. P. 539—547.
243. Bereiter-Hahn J., Fuhrmann C. Structural interactions of mitochondria in situ // *Endocytobiology*. 1983. Vol. 11. P. 281—289.
244. Bereiter-Hahn J., Scipel K.-H., Voith M., Ploem J. S. Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6G // *Cell Biochem. Funct.* 1983. Vol. 1. P. 147—155.
245. Berg H. C., Brown D. A. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking // *Nature*. 1972. Vol. 239. P. 500—504.
246. Berg H. C., Manson M. D., Conley M. P. Dynamics and energetics of flagellar rotation in bacteria // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1982. Vol. 35. P. 1—31.
247. Bernal S. D., Lampidis T. J., McIsaac R. M., Chen L. B. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye // *Science*. 1983. Vol. 222. P. 59—62.
248. Bernal S. D., Lampidis T. J., Summerhayes I. C., Chen L. B. Rhodamine 123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells in vitro // *Ibid.* 1982. Vol. 218. P. 1417—1419.
249. Bernardi P., Azzone G. F. Electroneutral H⁺—K⁺ exchange in liver mitochondria: regulation by membrane potential // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. Vol. 724. P. 212—223.
250. Berridge M. J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers // *Biochem. J.* 1984. Vol. 220. P. 345—360.
251. Berridge M. J., Irvine R. F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction // *Nature*. 1984. Vol. 312. P. 315—321.
252. Berzborn R. J., Müller D., Roos P., Andersson B. Significance of different quantitative determinations of photosynthetic ATP-synthase CF₁ for heterogeneous CF₁. Distribution and grana formation // *Photosynthesis*. 1981. Vol. 3. P. 107—120.
253. Beyereuther K., Bieselem B., Ehring R., Müller-Hill B. Methods in protein sequences analysis. Clifton: Humana press, 1981. 139 p.
254. Bhandari B., Naik M. S., Nicholas D. J. D. ATP production coupled to the denitrification of nitrate in *Rhizobium japonicum*, grown in cultures and in bacteroids from *Glycine max* // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 168. P. 321—326.

255. Bibb M. L., Van Etten R. A., Wright C. T., Clayton D. A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA // *Cell*. 1981. Vol. 26. P. 167—180.
256. Biden T. J., Wollheim C. B., Schlegel W. Inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular Ca²⁺ homeostasis in clonal pituitary cells (GH₃). Translocation of Ca²⁺ into mitochondria from a functionally discrete portion of the nonmitochondrial store // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 7223—7229.
257. Bielawski J., Thompson T. E., Lehninger A. L. The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membranes // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1966. Vol. 24. P. 943—947.
258. Biketov S. F., Kasho V. N., Kozlov I. A., Mileyskaya E. I., Ostrovsky D. N., Skulachev V. P., Tikhonova G. V., Tsuprun V. L. F₁-like ATPase from anaerobic bacterium *Lactobacillus casei* contains six similar subunits // *Europ. J. Biochem.* 1982. Vol. 129. P. 240—250.
259. Bivin D. B., Stoeckenius W. Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1986. Vol. 132. P. 2167—2177.
260. Black R. A., Hobson A. C., Adler J. Involvement of cyclic GMP in intracellular signaling in the chemotactic response of *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1980. Vol. 77. P. 3879—3883.
261. Blanchette-Mackie E. J., Scow R. O. Transport of fatty acids by lateral movement in membranes to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study // *J. Cell. Biol.* 1982. Vol. 95. P. 259—262.
262. Blankenship R. E., Feick R., Bruce B. D., Kirmaier C., Holten D., Fuller R. C. Primary photochemistry in the facultative green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *J. Cell. Biochem.* 1983. Vol. 22. P. 251—261.
263. Blankenship R. E., Prince R. C. Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 382—383.
264. Blasie J. K., Pachence J. M., Tavormina A., Dutton P. L., Stamatoff J., Eisenberger P., Brown G. The location of redox centers in biological membranes determined by resonance X-ray diffraction. II. Analysis of the resonance diffraction data // *Biochim. et biophys. acta*. 1982. Vol. 679. P. 188—197.
265. Blasie J. K., Pachence J. M., Tavormina A., Dutton P. L., Stamatoff J., Eisenberger P., Brown G. The location of redox centers in the profile structure of a reconstituted membrane containing a photosynthetic reaction center cytochrome *c* complex by resonance X-ray diffraction // *Ibid.* 1983. Vol. 723. P. 350—357.
266. Blaurock A. E., Stoeckenius W. Structure of the purple membrane // *Nature*. 1971. Vol. 233. P. 152—154.
267. Blaut M., Gottschalk G. Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri* // *Europ. J. Biochem.* 1984. Vol. 141. P. 217—222.
268. Blaut M., Gottschalk G. Evidence for a chemiosmotic mechanism of ATP synthesis in methanogenic bacteria // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 486—489.
269. Blaut M., Müller V., Fiebig K., Gottschalk G. Sodium ions and an energized membrane required by *Methanosarcina barkeri* for the oxidation of methanol to the level of formaldehyde // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 164. P. 95—101.
270. Blok M. C., Van Dam K. Association of bacteriorhodopsin-containing phospholipid vesicles with phospholipid-impregnated millipore filters // *Biochem. et biophys. acta*. 1978. Vol. 507. P. 48—61.
271. Blumwald E., Fortin M. G., Rea Pa, Verma D. P. S., Poole R. J. Presence of host-plasma membrane type H⁺—ATPase in the membrane en-

- velope enclosing the bacteroids in soybean root nodules // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 78. P. 665—672.
272. *Blumwald E., Poole R.* Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* // *Ibid.* P. 163—167.
273. *Bodie A. F., Gray C. T.* Phosphorylation coupled to oxidation in bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1956. Vol. 219. P. 853—862.
274. *Boekema E. J., Berden J. A., Van Heel M. G.* Structure of mitochondrial F₁-ATPase studied by electron microscopy and image processing // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 851. P. 353—360.
275. *Bogomolni R. A., Spudich J. L.* Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 6250—6254.
276. *Bogomolni R. A., Taylor M. E., Stoekenius W.* Reconstitution of purified halorhodopsin // *Ibid.* 1984. Vol. 81. P. 5408—5411.
277. *Bokranz M., Morschel E., Kröger A.* Structural and ATP-hydrolyzing properties of the ATP synthase isolated from *Wolinella succinogenes* // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 810. P. 84—93.
278. *Bombelka E., Richter F.-W., Stroh A., Kadenbach B.* Analysis of the Cu, Fe, and Zn contents in cytochrome *c* oxidase // *Biochem. a Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 140. P. 1007—1014.
279. *Bonaventura C., Myers J.* Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa* // *Biochim. et biophys. acta.* 1969. Vol. 189. P. 366—383.
280. *Bonitz S. G., Coruzzi C., Thalenfeld B. E., Tzagoloff A., Macino G.* Assembly of mitochondrial membrane system. Structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit I of yeast cytochrome oxidase // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255. P. 11927—11941.
281. *Bonnerjea J. R., Evans M. C. W.* Evidence that the lowpotential (—700 mV) electron acceptor (X) in photosystem I has two iron-sulphur centres // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 767. P. 153—159.
282. *Borchart U., Machleidt W., Schagger H., Link T. A., Jagow G. von.* Isolation and amino acid sequence of the 8 kDa DCCD-binding protein of beef heart ubiquinol: cytochrome *c* reductase // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 191. P. 125—130.
283. *Borchart U., Machleidt W., Schagger H., Link T. A., Jagow G. von.* Isolation and amino acid sequence of the 9.5 kDa protein of beef heart ubiquinol: cytochrome *c* reductase // *Ibid.* 1986. Vol. 200. P. 81—86.
284. *Borgström B., Sudduth H. C., Lehninger A. L.* Phosphorylation coupled reduction of cytochrome *c* by β -hydroxybutyrate // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 215. P. 571—577.
285. *Borisov A. Yu., Godik V. I.* Excitation energy transfer in photosynthesis // *Biochim. et biophys. acta.* 1973. Vol. 301. P. 221—248.
286. *Bouilland F., Ricquier O., Gulik-Krzywicki T., Gary-Bobo C. M.* The possible proton translocating activity of the mitochondrial uncoupling protein of brown adipose tissue // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 164. P. 272—276.
287. *Bouilland F., Ricquier D., Thibault J., Weissenbach J.* Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 445—448.
288. *Bouilland F., Weissenbach J., Ricquier D.* Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 1487—1490.
289. *Boutry M., Briquet M., Goffeau A.* The subunit of a plant mitochondrial F₁-ATPase is translated in mitochondria // *Ibid.* 1983. Vol. 258. P. 8524—8526.
290. *Bowman E. J.* Comparison of the vacuolar membrane ATPase of *Neurospora crassa* with the mitochondrial and plasmic membrane ATPases // *Ibid.* 1983. Vol. 258. P. 15238—15244.

291. *Bowman E. J., Bowman B. J. C.* Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of *Neurospora crassa* // *J. Bacteriol.* 1982. Vol. 151. P. 1326—1337.
292. *Boyer P. D., Cross R. L., Morsen W.* A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1973. Vol. 70. P. 2837—2839.
293. *Bragg P. D.* The ATPase complex of *Escherichia coli* // *Canad. J. Biochem. a Cell Biol.* 1984. Vol. 62. P. 1190—1197.
294. *Bragg P. D., Hou C.* Chemical crosslinking of α -subunit in the F₁ adenosine triphosphatase of *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. a Biophys.* 1986. Vol. 244. P. 361—372.
295. *Brand M. D., Al-Shawi M. K., Brown G. C., Price B. D.* Thermodynamic and steady-state-kinetic investigation of the effect of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide on H⁺ translocation by the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex // *Biochem. J.* 1985. Vol. 225. P. 407—411.
296. *Brandolin G., Doussiere J., Gulik A., Gulik-Krzywicki T., Lauquin G. J. M., Vignais P. V.* Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. Vol. 592. P. 592—614.
297. *Brandt J. T., Martin A. P., Lucas F. V., Vorbeck M. L.* The structure of rat liver mitochondria. A reevaluation // *Biochem. a Biophys. Res. Commun.* 1974. Vol. 59. P. 1097—1102.
298. *Braumann T., Grimme L. H.* Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by highperformance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* 1979. Vol. 170. P. 264—268.
299. *Braumann T., Vasmel H., Grimme L. H., Amesz J.* Pigment composition of the photosynthetic membrane and reaction center of the green bacterium *Prosthecochloris aestuarii* // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 848. P. 89—91.
300. *Bredt W.* Motility of mycoplasmas // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1973. Vol. 225. P. 246—250.
301. *Bremer J.* Carnitine — metabolism and functions // *Physiol. Rev.* 1983. Vol. 63. P. 1420—1480.
302. *Bremer W., Kooistra L., Hellingwerf K. J., Konings W. N.* Role of the electrochemical proton gradient in genetic transformation of *Haemophilus influenzae* // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 157. P. 868—873.
303. *Brennan N. A., Bird E. D., Aprilla J. R.* Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain // *J. Neurochem.* 1985. Vol. 14. P. 1948—1950.
304. *Breton J.* Orientation of the chromophores in the reaction center of *Rhodospirillum rubrum*. Comparison of low-temperature linear dichroism spectra with a model derived from X-ray crystallography // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 810. P. 235—245.
305. *Brink B. T., Otto R., Hansen H.-P., Konings W. N.* Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 162. P. 383—390.
306. *Briskin D. P., Thornley W. R., Wyse R. E.* Membrane transport in isolated vesicles from sugarbeet taproot // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 78. P. 871—875.
307. *Brodie A. F.* Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. I. The role of soluble factors // *J. Biol. Chem.* 1959. Vol. 234. P. 398—404.
308. *Bromberg R.* Mitochondrial fragmentation during germination in *Blasotocladia emersonii* // *Develop. Biol.* 1974. Vol. 36. P. 187—194.
309. *Brown G. G., Simpson M. V.* Novel features of animal mtDNA evolution shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 3246—3250.

310. Brown I. I., Galperin M. Yu., Glagolev A. N., Skulachev V. P. Utilization of energy stored in the form of Na^+ and K^+ ion gradient by bacterial cells // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 134. P. 345–349.
311. Brown I. I., Kirik I. I., Fadeev S. I. Role of Na^+ in photosynthetic processes of marine cyanobacteria *Oscillatoria brevis* // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984. P. 292.
312. Brown I. I., Kirik I. I., Severina I. I., Fadeev S. I. Electrochemical Na^+ gradient couples processes of light energy transduction in marine cyanobacterium *Oscillatoria brevis* // XVII FEBS Meet. Abstr. West Berlin, 1986. P. 145.
313. Brown J. E., Rubin L. J. A direct demonstration that inositoltriphosphate induces an increase in intracellular calcium in *Limulus* photoreceptors // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol. 125. P. 1137–1142.
314. Brown J. E., Rubin L. J., Ghalayini A. J., Tarver A. P., Irvine R. F., Berridge M. J., Anderson R. E. Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptors // *Nature.* 1984. Vol. 311. P. 160–163.
315. Brown K. T., Murakami M. A new receptor potential of the monkey retina with no detectable latency // *Ibid.* 1964. Vol. 201. P. 626–628.
316. Browning K. S., Raj Bhandary U. L. Cytochrome oxidase subunit III gene in *Neurospora crassa* mitochondria. Location and sequence // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 5253–5256.
317. Bruce B. D., Fuller R. C., Blankenship R. E. Primary photochemistry in the facultatively aerobic green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 6532–6536.
318. Brummer B., Bertl A., Potrykus I., Felle H., Parish R. W. Evidence that fusaric acid and indole-3-acetic acid induce cytosolic acidification of *Zea mays* cells // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 189. P. 109–114.
319. Brummer B., Felle H., Parish R. W. Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump // *Ibid.* 1984. Vol. 174. P. 223–227.
320. Brummer B., Parish R. W. Mechanisms of auxin-induced plant cell elongation // *Ibid.* 1983. Vol. 161. P. 9–13.
321. Brummer B., Parish R. W. Mechanisms of auxin-induced plant cell elongation: a reply to the commentary by H. Göring // *Ibid.* 1985. Vol. 188. P. 181–183.
322. Bryan L. E., Van den Elzen H. M. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible resistant bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977. Vol. 12. P. 163–177.
323. Bubenzer H.-J. Die dünnen und die dicken Muskelfasern des Zwerchfells der Ratte // *Ztschr. Zellforsch.* 1966. Bd. 69. S. 520–550.
324. Bubenzer H.-J. Die Strukturen der Skelettmuskelfaser im Hinblick auf ihre Funktionen // *Umschau.* 1967. Bd. 2. S. 52–57.
325. Büchel D. E., Groneborn B., Müller-Hill B. Sequence of the lactose permease gene // *Nature.* 1980. Vol. 283. P. 541–545.
326. Buckel W. Biotin-dependent decarboxylases as bacterial sodium pumps: purification and reconstitution of glutamyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans* // *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 125. P. 547–558.
327. Buckel W., Semmler R. A biotin-dependent sodium pump: CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans* // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 148. P. 35–38.
328. Buckel W., Semmler R. Purification, characterization and reconstitution of glutamyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 136. P. 427–434.
329. Budzinska M., Chojnicki K., Michejda J. Sites involved in generation

- of membrane potential of ascarid muscle mitochondria // IV Europ. bioener. Conf. Prague. 1986. P. 313.
330. Bukowiecki L. J. Mechanisms of stimulus-calorigenesis coupling in brown adipose tissue // *Canad. J. Biochem. a Cell Biol.* 1984. Vol. 62. P. 623–630.
331. Bulychev A. A., Andrianov V. K., Kurella G. A., Litvin F. F. Micro-electrode measurements of the transmembrane potential of chloroplasts and its photoinduced changes // *Nature.* 1972. Vol. 236. P. 175–177.
332. Bulychev A. A., Andrianov V. K., Kurella G. A., Litvin F. F. Photoinduction kinetics of electrical potentials in a single chloroplast as studied with micro-electrode technique // *Biochim et biophys. acta.* 1976. Vol. 430. P. 336–351.
333. Burger G., Scriven C., Machleidt W., Werner S. Subunit I of cytochrome oxidase from *Neurospora crassa*: nucleotide sequence of the coding gene and partial amino acid sequence of the protein // *EMBO J.* 1982. Vol. 1. P. 1385–1391.
334. Burton M., Moore J. The mitochondrion of the flagellate, *Polytomella agilis* // *Ultrastruct. Res.* 1974. Vol. 48. P. 414–419.
335. Buse G., Biewald R., Raable G., Fleischhauer J. Structural facts for the site of e^- and H^+ translocation in cytochrome *c* oxidase // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 119.
336. Buse G., Steffens G. C. M., Steffens G. J., Meinecke L., Biewald R., Erdweg M. Cytochrome *c*-oxidase: present status of the sequence analysis // II Europ. bioenerg. conf. Lyon. 1982. P. 163–164.
337. Caderbaum A. I., Lieber C. S., Beattie D. S., Rubin E. Characterization of shuttle mechanisms for the transport of reducing equivalents into mitochondria // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1973. Vol. 158. P. 763–781.
338. Cafiso D. S., Hubbel W. L. Light-induced interfacial potentials in photoreceptor membranes // *Biophys. J.* 1980. Vol. 30. P. 243–264.
339. Cairney J., Higgins C. F., Booth I. R. Proline uptake through the major transport system of *Salmonella typhimurium* is coupled to sodium ions // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 160. P. 22–27.
340. Calvayrac R. Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez *Euglena gracilis* // *Arch. Microbiol.* 1970. Vol. 73. P. 308–314.
341. Capaldi R. A. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. Vol. 694. P. 291–306.
342. Capaldi R. A., Gonzalez-Halphen D., Takamiya S. Sequence homologies and structural similarities between the polypeptides of yeast and beef heart cytochrome *c* oxidase // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 207. P. 11–17.
343. Carafoli E. Biochemistry of plasma membrane calcium transporting systems // *The enzymes of biological membranes* / Ed. A. N. Martonosi. L.: Plenum press, 1985. Vol. 3. P. 235–248.
344. Carafoli E., Inesi G., Rosen B. P. Calcium transport across biological membranes // *Metal ions in biological systems* / Ed. H. Sigel. N. Y.; Basel: Dekker, 1984. Vol. 17. P. 130–186.
345. Carafoli E., Zurini M., Benaim G. The purified calcium-pumping ATPase of plasma membrane. Structure—function relationships // *Calcium in biological systems* / Ed. R. P. Rubin et al. L.: Plenum press, 1985. P. 265–273.
346. Carper S. W., Lancaster J. R. An electrogenic sodium-translocating ATPase in *Methanococcus voltae* // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 200. P. 177–180.
347. Carter H. E., Bhattacharyya P. K., Weidman K. R., Fraenkel G. Chemical studies on vitamin B_2 isolation and characterization as carnitine // *Arch. Biochem. a Biophys.* 1956. Vol. 38. P. 405–416.
348. Carty S. E., Johnson R. G., Scarpa E. Electrochemical proton gradient in dense granules isolated from anterior pituitary // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 7269–7273.

349. Casadio R., Stoeckenius W. Effect of protein-protein interaction on light adaptation of bacteriorhodopsin // *Biochemistry*. 1980. Vol. 19. P. 3374—3381.
350. Casey R. P. Membrane reconstitution of the energy-conserving enzymes of oxidative phosphorylation // *Biochim. et biophys. acta*, 1984. Vol. 768. P. 319—347.
351. Casey R. P., Njus D., Radda G. K., Sehr P. A. Active proton uptake by chromaffin granules: observation by amine distribution and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance techniques // *Biochemistry*. 1977. Vol. 16. P. 972—977.
352. Casey R. P., Thelen M., Azzi A. Dicyclohexylcarbodiimide binds specifically and covalently to cytochrome *c* oxidase while inhibiting its H⁺-translocating activity // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255. P. 3994—4000.
353. Castellini M. A., Somero G. N. Buffering capacity of vertebrate muscle: correlations with potentials for anaerobic function // *J. Comp. Physiol.* 1981. Vol. 143. P. 191—198.
354. Castle A. M., Macnab R. M., Shulman R. G. Coupling between the sodium and proton gradients in respiring *Escherichia coli* cells measured by [²³Na] and [³¹P] nuclear magnetic resonance // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 7797—7806.
355. Cerletti N., Bohni P. C., Suda K. Import of proteins into mitochondria. Isolated yeast mitochondria and solubilized matrix protease correctly process cytochrome *c* oxidase subunit V precursor at the NH₂ terminus // *Ibid.* 1983. Vol. 258. P. 4944—4949.
356. Cervetto L., Pasino E., Torre V. Electrical responses of rods in the retina of *Bufo marinus* // *J. Physiol.* 1977. Vol. 267. P. 17—51.
357. Chailakhyan L. M., Glagolev A. N., Glagoleva T. N., Murvanidze G. V., Potapova T. V., Skulachev V. P. Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria // *Biochim. et biophys. acta*. 1982. Vol. 679. P. 60—67.
358. Chan S. H. P., Freedman J. A. The effect of specific antibodies on oxygen uptake and H⁺ pumping by cytochrome *c* oxidase vesicles // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 162. P. 344—348.
359. Chance B. Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells // *Nature*, 1952. Vol. 169. P. 215—221.
360. Chance B., Hagihara B. Direct spectroscopic measurements of interaction of components of the respiratory chain with ATP, ADP, phosphate, an uncoupling agents // *V intern. Biochem. Congr. Moscow*, 1963. Vol. 5. P. 3—33.
361. Chance B., Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. VI. The efficiency of the reaction // *J. Biol. Chem.* 1961. Vol. 236. P. 1577—1584.
362. Chance B., Williams G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra // *Ibid.* 1955. Vol. 217. P. 395—407.
363. Chance B., Williams G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // *Adv. Enzymol.* 1956. Vol. 17. P. 65—134.
364. Chang C.-H., Chen J.-G., Govindjee R., Ebrey T. Cation binding by bacteriorhodopsin // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 396—400.
365. Chang C.-H., Govindjee R., Ebrey T., Bagley K. A., Dollinger G., Eisenstein L., Marque J., Roder H., Vittitow J., Fang J., Nakanishi K. Trans/13-*cis* isomerization is essential for both the photocycle and proton pumping of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* 1985. Vol. 47. P. 509—512.
366. Chanson A., Fichmann J., Spear D., Taiz L. Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 79. P. 159—164.
367. Chappell J. B., Haarhoff K. N. The uptake of cations by mitochondria // III FEBS Meet. Abstr. Warszawa, 1966. P. 10.
368. Chappell J. B., Haarhoff K. N. The penetration of the mitochondrial

- membrane by anions and cations // *Biochemistry of mitochondria* / Ed. E. C. Slater et al. L.: Acad. press, 1967. P. 75—91.
369. Chaustova L. P., Grinius L. L., Griniuviene B. B., Jasaitis A. A., Kadziauskas J. P., Kiausinyte R. V. Studies on energy supply for genetic processes. Involvement of membrane potential // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 103. P. 349—357.
370. Chen C.-C., Tsuchiya T., Yamane Y., Wood J. M., Wilson T. H. Na⁺(Li⁺)-proline cotransport in *Escherichia coli* // *J. Membrane Biol.* 1985. Vol. 84. P. 157—164.
371. Chen J., Meeuse B. J. D. Induction of indole synthesis in the appendix of *Sauromatum guttatum* shots // *Plant a. Cell Physiol.* 1972. Vol. 13. P. 831—841.
372. Chen J.-W., Sun Q., Hwang F. Properties of the membrane-bound Mg²⁺-ATPase isolated from *Acholeplasma laidlawii* // *Biochim. et biophys. acta*, 1984. Vol. 777. P. 151—154.
373. Chen L., Tai P. G. ATP is essential for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 4384—4388.
374. Chen L. B., Summerhayes I. C., Johnson L. V., Walsh M. L., Bernal S. D., Lampidis T. J. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123 // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1982. Vol. 46. P. 141—155.
375. Cheneval D., Müller M., Carafoli E. The mitochondrial phosphate carrier reconstituted in liposomes is inhibited by doxorubicin // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 159. P. 123—126.
376. Chernyak B. V., Dibrov P. A., Glagolev A. N., Sherman M. Yu., Skulachev V. P. A novel type of energetics in a marine alkali-tolerant bacterium. ΔμNa-driven motility and sodium cycle // *Ibid.* Vol. 164. P. 38—42.
377. Chernyak B. V., Kozlov I. A. Adenylylimidodiphosphate release from the active site of submitochondrial particles ATPase // *Ibid.* 1979. Vol. 104. P. 215—219.
378. Chiesi M., Zurini M., Carafoli E. ATP synthesis catalyzed by the purified erythrocyte Ca-ATPase in the absence of calcium gradients // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23. P. 2595—2600.
379. Chumakov K. M. Evolution of nucleotide sequences // *Sovjet scientific review: Phys. chem. biol.* / Ed. V. P. Skulachev. Amsterdam: OPA, 1987. P. 52—95.
380. Cidon S., Ben-David H., Nelson N. ATP-driven proton fluxes across membranes of secretory organelles // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 11684—11688.
381. Cidon S., Nelson N. Novel ATPase in the chromaffin granule membrane // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 2892—2898.
382. Cidon S., Nelson N. Purification of N-ethylmaleimide-sensitive ATPase from chromaffin granule membranes // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 9222—9227.
383. Clark A. J., Cotton N. P. J., Jackson J. B. The relation between membrane ionic current and ATP synthesis in chromatophores from *Rhodospseudomonas capsula* // *Biochim et biophys. acta* 1983. Vol. 723. P. 440—453.
384. Clark A. J., Jackson J. B. The measurement of membrane potential during photosynthesis and during respiration in intact cells of *Rhodospseudomonas capsulata* by both electrochromism and by permeant ion redistribution // *Biochem. J.* 1981. Vol. 200. P. 389—397.
385. Clark R. D., Hind G. Isolation of a five-polypeptide cytochrome *b-f* complex from spinach chloroplasts // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 10348—10354.
386. Clark R. D., Hind G. Spectrally distinct cytochrome *b-563* components in a chloroplast cytochrome *b-f* complex: interaction with a hydroxy-

- quinoline N-oxide // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1983. Vol. 80. P. 6249—6253.
387. *Clarke D. J., Fuller F. M., Morris J. G.* The protontranslocating adenosine triphosphatase of the obligately anaerobic bacterium *Clostridium pasteurianum*. I. ATP phosphohydrolase activity // *Europ. J. Biochem.* 1979. Vol. 98. P. 597—612.
 388. *Clarke O. M., Bragg P. D.* Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli* // *Ibid.* 1985. Vol. 149. P. 517—523.
 389. *Clayton R. K.* Photosynthesis. Physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge: Cambridge Univ. press, 1980. 281 p.
 390. *Cleveland L. R.* The fine structure of the flagellate *Mixotricha paradoxa* and its associated microorganisms // *Proc. Roy. Microscop. Soc.* 1964. Vol. 159. P. 668—685.
 391. *Cobbs W. H., Barkdoll A. E., Pugh E. N.* Cyclic GMP increases photo-current and light sensitivity of retinal cones // *Nature*. 1985. Vol. 317. P. 64—66.
 392. *Cohen G. N., Rickenberg H. V.* Etude directe de la fixation d'un inducteur de la α -galactosidase par les cellules d'*Escherichia coli* // *C. r. Acad. sci. D.* 1955. Vol. 240. P. 466—468.
 393. *Colbey J. C., Cox J. H.* Energy conservation in acidophilic bacteria // *Microbiol. Rev.* 1983. Vol. 47. P. 579—595.
 394. *Cole S. T., Condon C., Lemire B. D., Weiner J. H.* Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulphur flavoenzyme of *Escherichia coli* // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 811. P. 381—403.
 395. *Collins J. M., Foster K. A.* Differentiation of promyelocytic (HL-60) cells into mature granulocytes: mitochondrial-specific rhodamine 123 fluorescence // *J. Cell Biol.* 1983. Vol. 96. P. 94—99.
 396. *Colombini M.* The mechanisms and roles of anion and proton transport in mitochondria function // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1980. Vol. 341. P. 552—563.
 397. *Colowick S. P., Kaplan N. O., Neufeld E. F., Ciotti M. M.* Pyridine nucleotide transhydrogenase. I. Indirect evidence for the reaction and purification of the enzyme // *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 195. P. 95—106.
 398. *Cone R. A.* Early receptor potential: photoreversible charge displacement in rhodopsin // *Science*. 1967. Vol. 155. P. 1128—1131.
 399. *Conway E. J., Brady T. G.* Source of the hydrogen ions in gastric juice // *Nature*. 1978. Vol. 162. P. 456—457.
 400. *Cook W. R., Kalb V. F., Peace A. A., Bernlohr R. W.* Is cyclic guanosine 3',5'-monophosphate a cell cycle regulator? // *J. Bacteriol.* 1980. Vol. 141. P. 1450—1453.
 401. *Cooper C., Devlin T., Lehninger A. L.* Oxidative phosphorylation in an enzyme fraction from mitochondrial extracts // *Biochim. et biophys. acta.* 1955. Vol. 18. P. 159—160.
 402. *Copeland B. R., Landick R., Naros P. M., Oxender D. L.* Role of membrane potential in protein folding and domain formation during secretion in *Escherichia coli* // *J. Cell. Biochem.* 1984. Vol. 24. P. 345—356.
 403. *Corrigall J., Tselentis B. S., Mombray J.* The efficiency of oxidative phosphorylation and the rapid control by thyroid hormone of nicotinamide nucleotide reduction and transhydrogenation in intact rat liver mitochondria // *Europ. J. Biochem.* 1984. Vol. 141. P. 435—440.
 404. *Corrucci G., Tzagoloff A.* Assembly of mitochondrial membrane systems. DNA sequence of subunit 2 of yeast cytochrome oxidase // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 9324—9330.
 405. *Cortijo M., Alonso A., Gomez-Fernandez J. C., Chapman D.* Intrinsic protein-lipid interaction. Infrared spectroscopic studies of gramicidin A, bacteriorhodopsin and Ca^{2+} -ATPase in biomembranes and reconstituted systems // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 157. P. 597—618.

406. *Coulton J. W., Murray R. G. E.* Cell envelope associations of *Aquaspirillum serpens* flagella // *J. Bacteriol.* 1978. Vol. 136. P. 1037—1049.
407. *Cox G. B., Fimmel A. L., Gibson F., Hatch L.* The mechanism of ATP synthase: a reassessment of the functions of the b and a subunits // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 849. P. 62—69.
408. *Cramer W. A., Widger W. R., Herrmann R. G., Trebst A.* Topography and function of thylakoid membrane proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 126—129.
409. *Crane F. L.* Transplasma — membrane redox systems in growth and development // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 811. P. 233—264.
410. *Crane F. L., Löw H.* NADH oxidation in liver and fat cell plasma membranes // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 68. P. 153—156.
411. *Crider B. P., Carper S. W., Lancaster J. R.* Electron transfer-driven ATP synthesis in *Methanococcus voltae* is not dependent on a proton electrochemical gradient // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1985. Vol. 82. P. 6793—6796.
412. *Crofts A. R., Wraight C. A.* The electrochemical domain of photosynthesis // *Biochim. et biophys. acta.* 1983. Vol. 426. P. 149—185.
413. *Cross R. L., Boyer P. D.* Evidence for detection of ATP^{32}P bound at the coupling sites of mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1973. Vol. 51. P. 56—59.
414. *Crouch R. K., Or Y. S., Ghent S.* Neither the retinal ring nor the ring double bond is required for proton pumping in bacteriorhodopsin: acyclic retinal bacteriorhodopsin analogues // *J. Amer. Chem. Soc.* 1984. Vol. 106. P. 8325—8327.
415. *Cunningham S., Rial E., Nicholls D. G.* Bioenergetic characterization of human brown fat mitochondria // III *Europ. bioenerg. conf.* Hannover, 1984. Vol. B. P. 477—478.
416. *D'Souza M. P., Wilson D. F.* Adenine nucleotide efflux in mitochondria induced by inorganic pyrophosphatase // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. Vol. 680. P. 28—32.
417. *D'Souza S. F., Srere P. A.* Binding of citrate synthase to mitochondrial inner membranes // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 4706—4709.
418. *Dahl J. S., Block K.* Proteolipid formation in *Mycoplasma capricolum* // *Ibid.* P. 11814—11818.
419. *Dancshazy Z., Govindjee R., Nelson B., Ebrey T. G.* A new intermediate in the photocycle of bacteriorhodopsin // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 209. P. 44—48.
420. *Danielli J. F.* Experiment, hypothesis and theory in the development of concepts of cell membrane structure. 1930—1970 // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y., L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 3—14.
421. *Daniels C., Bole D. G., Quay S. C., Oxender D. L.* Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1981. Vol. 78. P. 5396—5400.
422. *Daniels L., Sparling R., Sprout G. D.* The bioenergetics of methanogenesis // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 768. P. 113—163.
423. *Daniels M. T., Longland T. M., Gilbert T.* Aspects of motility and chemotaxis in *Spiroplasmas* // *J. Gen. Microbiol.* 1980. Vol. 118. P. 429—436.
424. *Danielson L., Ernster L.* Demonstration of a mitochondrial energy-dependent pyridine nucleotide transhydrogenase reaction // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1963. Vol. 10. P. 91—101.
425. *Danielson L., Ernster L.* Energy-dependent reduction of triphosphopyridine nucleotide by reduced diphosphopyridine nucleotide, coupled to the energy-transfer system of the respiratory chain // *Biochem. Ztschr.* 1963. Vol. 338. P. 188—205.
426. *Dankert J. R., Esser A. F.* Complement-mediated killing of *Escherichia coli*: Dissipation of membrane potential by a C9-derived peptide // *Biochem. biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 25. P. 109—1100.

427. *Danon A., Stoeckenius W.* Photophosphorylation in *Halobacterium halobium* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1974. Vol. 71. P. 1234—1238.
428. *Darszon A.* Strategies in the reassembly of membrane proteins into lipid bilayer systems and their functional assay // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1983. Vol. 15. P. 321—334.
429. *Darzynkiewicz Z., Staiano-Coico L., Melamed M. R.* Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1981. Vol. 78. P. 2383—2387.
430. *Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J., Melamed M. R.* Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry // *Cancer Res.* 1982. Vol. 42. P. 799—806.
431. *Date T., Zwizinski C., Ludmerer S., Wickner W.* Mechanisms of membrane assembly: effects of energy poisons on the conversion of soluble M13 coliphage // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1980. Vol. 77. P. 827—831.
432. *Daum G., Gasser S. M., Schatz G.* Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the inter membrane space enzyme cytochrome b_5 by isolated yeast mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 13075—13080.
433. *Davey C. L.* The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1960. Vol. 89. P. 303—308.
434. *Davidson M., Garland G.* Structure of mitochondria and vacuoles of *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe* studied by electron microscopy of serial thin sections and model building // *J. Gen. Microbiol.* 1977. Vol. 98. P. 147—153.
435. *Davies K. J. A., Quantanilha A. T., Brooks G. A., Packer L.* Free radicals and tissue damage produced by exercise // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1982. Vol. 107. P. 1198—1205.
436. *Davies R. E., Krebs H. A.* Biochemical aspects of the transport of ions by nervous tissue // *Symp. Biochem. Soc.* 1952. Vol. 8. P. 77—92.
437. *Davies R. E., Ogston A. G.* On the mechanism of secretion of ions by gastric mucosa and other tissues // *Biochem. J.* 1950. Vol. 46. P. 324—333.
438. *Davis C. G., Hestrin S., Landahl H., Gordon A. S., Diamond I., Korenbrot J. I.* Activation of acetylcholine receptors causes the partition of hydrophobic cation into postsynaptic membrane vesicles // *Nature.* 1983. Vol. 302. P. 525—528.
439. *De Groot B. J., Van Gorkom H. J., Meiburg R. F.* Electrochromic absorbance changes in spinach chloroplasts induced by an external electric field // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. Vol. 589. P. 294—314.
440. *De Groot H., Noll T., Sies H.* Oxygen dependence and subcellular partitioning of hepatic menadione-mediated oxygen uptake // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1985. Vol. 243. P. 556—562.
441. *De Meis L.* The sarcoplasmic reticulum: Transport and energy transduction. N. Y.; Chichester; Bristane; Toronto: Wiley, 1981. 166 p.
442. *De Meis L., Inesi G.* ATP synthesis by sarcoplasmic reticulum ATPase following Ca^{2+} , pH, temperature and water activity jumps // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 1289—1294.
443. *De Michelis M. I., Pugliarello M. C., Rasi-Caldogno F.* Two distinct proton translocating ATPases are present in membranes vesicles from radish seedlings // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 162. P. 85—90.
444. *De Pamphilis M. L., Adler J.* Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1971. Vol. 105. P. 384—395.
445. *De Robertis E. D. P., Nowinski W. W., Saez F. A.* General cytology. Philadelphia: Saunders, 1976. 555 p.
446. *De Rosa M., de Rosa S., Gambacorta A., Bu'Lock J. D.* Structure of calditol, a new branched-chain monitol and of the derived tetraether lipids in thermoacidophile archaeobacteria of the *Caldariella* group // *Phytochemistry.* 1980. Vol. 19. P. 249—254.

447. *De Rosa M., de Rosa S., Cambacorta A., Mihale L., Bu'Lock J. D.* Chemical structure of the ether lipids of thermophilic acidophilic bacteria of the *Caldariella* group // *Ibid.* 1977. Vol. 16. P. 1961—1965.
448. *De Vitry C., Carles C., Diner B. A.* Quantitation of plastoquinone-9 in photosystem II reaction center particles // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 196. P. 203—206.
449. *De Vries S., Albracht S. P. J., Berden J. A., Slater E. C.* A new species of bound ubiquinone anion in QH_2 : cytochrome c oxidoreductase // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 11996—11998.
450. *Dean G. E., Fishkes H., Nelson P. J., Rudnick G.* The hydrogen ion-pumping adenosine-triphosphatase of platelet dense granule membrane. Differences from F_1F_0 - and phosphoenzyme-type ATPase // *Ibid.* 1984. Vol. 259. P. 9569—9574.
451. *Deatherage J. F., Henderson R., Capaldi R. A.* Threedimensional structure of cytochrome c oxidase vesicle crystals in negative stain // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 158. P. 487—499.
452. *Debus R. J., Feher G., Okamura M. Y.* LM complex of reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26: characterization and reconstitution with the H subunit // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 2488—2500.
453. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.* X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 180. P. 385—398.
454. *Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H.* Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution // *Nature.* 1985. Vol. 318. P. 618—624.
455. *Deisenhofer J., Michel H., Huber R.* The structural basis of photosynthetic light reactions in bacteria // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 243—248.
456. *Del Castillo J. R., Robinson J. W. L.* Na^+ -stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea-pig small intestinal epithelial cells // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 812. P. 413—422.
457. *Dell'Autone P.* Electrogenicity of the lysosomal proton pump // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 168. P. 15—22.
458. *Demin V., Kuzin A., Barnakov A., Linev A., Dzhandzhugazyan K., Mo-dyanov N., Ovchinnikov Yu.* Three-dimensional structure of Na, K -ATPase revealed by electron microscopy of two-dimensional crystals // XVII FEBS Meet. Abstr. Albufeira, 1985. P. 74.
459. *Dencher N. A.* The five retinal-protein pigments of halobacteria: bacteriorhodopsin, halorhodopsin, P565, P370 and slow-cycling rhodopsin // *Photochem. a. Photobiol.* 1983. Vol. 38. P. 753—767.
460. *Depocas F., Behrens W. A., Foster D. O.* Noradrenaline-induced calorigenesis in warm- and coldacclimated rats, the interrelation of dose of noradrenaline, its concentration in arterial plasma and calorogenic response // *Canad. J. Physiol. a. Pharmacol.* 1970. Vol. 56. P. 168—174.
461. *Deprez J., Trissl H.-W., Breton J.* Excitation trapping and primary charge stabilization in *Rhodospseudomonas viridis* cells, measured electrically with picosecond resolution // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 1699—1703.
462. *Deutsch A., Eggleton J.* The titration constants of anserine, carnosine and some related compounds // *Biochem. J.* 1938. Vol. 32. P. 209—211.
463. *DiMauro S., Bonilla E., Zeviani M., Nakagawa M., de Vivo D. C.* Mitochondrial myopathies // *Ann. Neurol.* 1985. Vol. 17. P. 521—538.
464. *Dibrov P. A., Glagolev A. N., Kostyrko V. A., Sherman M. Yu., Skulachev V. P., Smirnova I. A.* Energetics of the marine alkalotolerant bacterium *Vibrio alginolyticus*: Na^+ -dependent motility and the Na^+ -cycle // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984. P. 292.

465. Dibrov P. A., Kostyrko V. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Smirnova I. A. The sodium cycle. I. Na^+ -dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus* // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. Vol. 850. P. 449—457.
466. Dibrov P. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Verkhovskaya M. L. The sodium cycle. II. Na^+ -dependent oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus* // *Ibid.* P. 458—465.
467. Dimroth P. A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate // *FEBS. Lett.* 1980. Vol. 122. P. 234—236.
468. Dimroth P. Characterization of a membrane-bound biotin-containing enzyme: oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes* // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 115. P. 353—358.
469. Dimroth P. The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na^+ -activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes* // *Ibid.* 1982a. Vol. 121. P. 443—449.
470. Dimroth P. The role of biotin and sodium in the decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes* // *Ibid.* 1982b. Vol. 121. P. 435—441.
471. Dimroth P. Na^+ as coupling ion in decarboxylation-dependent energy conversions // XVII FEBS Meet. Abstr. West Berlin, 1986. P. 66.
472. Dimroth P., Hilpert W. Sodium transport decarboxylase // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984a. P. 71.
473. Dimroth P., Hilpert W. Carboxylation of pyruvate and acetyl coenzyme A by reversal of the Na^+ -pumps oxaloacetate decarboxylase and methylmalonyl-CoA decarboxylase // *Biochemistry*. 1984b. Vol. 23. P. 5360—5366.
474. Dimroth P., Thomer A. Subunit composition of oxaloacetate decarboxylase and characterization of the chain as carboxyl transferase // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 137. P. 107—112.
475. Dimroth P., Thomer A. Citrate transport in *Klebsiella pneumoniae* // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1986. Vol. 367. P. 813—823.
476. Dinant M., Kaminski K. ATP synthesis driven by a valinomycin induced K^+ diffusion potential in liposomes bear chloroplast ATP synthase // *Ztschr. Naturforsch. C*. 1984. Vol. 39. P. 320—321.
477. Dinur V., Honig B., Ottolenghi M. Analysis of primary photochemical process in bacteriorhodopsin // *Photochem. a Photobiol.* 1981. Vol. 33. P. 523—527.
478. Dokter M. E., Steinemann A., Schatz G. Mapping of yeast cytochrome c oxidase by fluorescence resonance energy transfer // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253. P. 311—317.
479. Dontsov A. E., Grinius L. L., Jasaitis A. A., Severina I. I., Skulachev V. P. A study on the mechanism of energy coupling in the redox chain. I. Transhydrogenase: the fourth site of the redox chain energy coupling // *J. Bioenerg.* 1972. Vol. 3. P. 277—303.
480. Dooijewaard G., de Bruin G. J. M., Van Dijk P. J., Slater E. C. Characterization of type-1 NADH dehydrogenase // *Biochim. et biophys. acta*. 1978. Vol. 501. P. 458—469.
481. Douce R., Holtz R. B., Benson A. A. Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplast // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248. P. 7215—7222.
482. Dougherty T. J. Hematoporphyrin derivative for detection and treatment of cancer // *J. Surg. Oncol.* 1980. Vol. 15. P. 209—210.
483. Dow J. A. T., Gupta B. L., Hall T. A., Harvey W. K. X-ray microanalysis of elements in frozen-hydrated sections of an electrogenic K^+ transport system: the posterior midgut of Tobacco hornworm (*Manduca sexta*) in vivo and in vitro // *J. Membrane Biol.* 1984. Vol. 77. P. 233—241.
484. Drachev A. L., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V. The action of lanthanum ions and formaldehyde on the proton-pumping function

- of bacteriorhodopsin // *Europ. J. Biochem.* 1984. Vol. 138. P. 349—356.
485. Drachev A. L., Markin V. S., Skulachev V. P. $\Delta\mu\text{H}^+$ -buffering by Na^+ and K^+ gradients in bacteria. Model and experimental systems // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. Vol. 811. P. 197—215.
486. Drachev L. A., Dracheva S. M., Samuilov V. D., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Photoelectric effects in bacterial chromatophores: comparison of spectral and direct electrometric methods // *Ibid.* 1984. Vol. 767. P. 257—262.
487. Drachev L. A., Frolov V. N., Kaulen A. D., Liberman E. A., Ostroumov S. A., Plakunova V. G., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 7059—7065.
488. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., La Van Chu, Severina I. I., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Cytochrome oxidase // *Ibid.* P. 7072—7076.
489. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemecek I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase. H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin // *Nature*. 1974. Vol. 249. P. 321—324.
490. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Mikelsaar H., Nemecek I. B., Semenov A. Yu., Semanova E. G., Severina I. I., Skulachev V. P. The reconstitution of biological molecular generators of electric current. H^+ -ATPase // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 7077—7082.
491. Drachev L. A., Kalamkarov G. R., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A., Skulachev V. P. Animal rhodopsin as a photogenerator of an electric potential that increases photoreceptor membrane permeability // *FEBS Lett.* 1980. Vol. 119. P. 125—131.
492. Drachev L. A., Kalamkarov G. R., Kaulen A. D., Ostrovsky M. A., Skulachev V. P. Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. II. Visual rhodopsin // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 117. P. 471—481.
493. Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V. The action of lanthanum ions and formaldehyde on the proton-pumping function of bacteriorhodopsin // *Ibid.* 1984. Vol. 138. P. 349—356.
494. Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P. Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin // *Ibid.* 1981. Vol. 117. P. 461—470.
495. Drachev L. A., Kaulen A. D., Ostroumov S. A., Skulachev V. P. Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane // *FEBS Lett.* 1974. Vol. 39. P. 43—45.
496. Drachev L. A., Kaulen A. D., Semenov A. Yu., Severina I. I., Skulachev V. P. Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins // *Anal. Biochem.* 1979. Vol. 96. P. 250—262.
497. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P. Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 87. P. 161—167.
498. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P. Correlation of photochemical cycle, H^+ -release and uptake, and electric events in bacteriorhodopsin // *Ibid.* 1984. Vol. 178. P. 331—335.
499. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P., Voytsitsky V. M. Bacteriorhodopsin-mediated photoelectric responses in lipid/water systems // *J. Membrane Biol.* 1982. Vol. 65. P. 1—12.
500. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P., Zorina V. V. Protonation of a novel intermediate P is involved in the $\text{M} \rightarrow \text{bR}$ step of the bacteriorhodopsin photocycle // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 209. P. 316—320.

501. Drachev L. A., Kondrashin A. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Transhydrogenase // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 113. P. 243—248.
502. Drachev L. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P., Smirnova I. A., Chumakov S. K., Kononenko A. A., Rubin A. B., Uspenskaya N. Ya. Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. III. Bacterial photosynthetic redox system // *Ibid.* 1981. Vol. 117. P. 482—489.
503. Dracheva S. M., Drachev L. A., Konstantinov A. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P., Arutjunjan A. M., Shuvalov V. A., Zaberezhnaya S. Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complexes from *Rhodospseudomonas viridis* // *Ibid.* 1988. Vol. 171. P. 253—264.
504. Dracheva S. M., Drachev L. A., Zaberezhnaya S. M., Konstantinov A. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. Spectral, redox and kinetic characteristics of high-potential cytochrome *c* hemes in *Rhodospseudomonas viridis* reaction center // *FEBS. Lett.* 1986. Vol. 205. P. 41—46.
505. Draheim J. E., Cassim J. Y. Effects of dehydration on the structure of purple membrane // *Biophys. J.* 1983. Vol. 41. P. 331a.
506. Draheim J. E., Cassim J. Y. Large scale global structural changes of the purple membrane during the photocycle // *Ibid.* 1985. Vol. 47. P. 497—507.
507. Draheim J. E., Gibson N. J., Cassim J. Y. Pulsating channels during the photocycle of the purple membrane // *Photochem. a. Photobiol.* 1983. Vol. 37. P. TPM-B20.
508. Drahota Z., Alexandre A., Rossi C. R., Siliprandi N. Organization and regulation of fatty acid oxidation in mitochondria of brown adipose tissue // *Biochim. et biophys. acta.* 1970. Vol. 205. P. 491—498.
509. Drahota Z., Honova E., Hahn P. The effect of ATP and carnitine on the endogenous respiration of mitochondria from brown adipose tissue // *Experientia.* 1968. Vol. 24. P. 431—432.
510. Druckmann S., Ottolenghi M., Korenstein R. Timeresolved absorbance changes induced by fast acidification of bacteriorhodopsin in vesicle systems // *Biophys. J.* 1985. Vol. 47. P. 115—118.
511. Duell D. H., Thorn M. B. Effects of 2,3-dimercaptopropanol and antimycin on absorption spectra of heart-muscle preparations // *Biochim. et biophys. acta.* 1962. Vol. 59. P. 426—436.
512. Dunn R., McCoy J. M., Simsek M., Majumdar A., Chang C.-H., Raibhandary U. L., Khorana H. G. The bacteriorhodopsin gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1981. Vol. 78. P. 6744—6748.
513. Dupont C.-H., Mazat J. P., Guerin B. The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from p^+ and p^0 strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1985. Vol. 132. P. 1116—1123.
514. Dupuis A., Vignais P. V. Photolabeling of mitochondrial F_1 -ATPase by an azido derivative of the oligomycin — sensitivity conferring protein // *Ibid.* Vol. 129. P. 819—825.
515. Dupuis P., Corcoran T. C. and El-Sayed M. A. Importance of bound divalent cations to the tyrosine deprotonation during the photocycle of bacteriorhodopsin // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 3662—3664.
516. Duschl A., Sawatzki R., Wagner G. Primary and secondary ion transport in *Halobacterium halobium* via bacteriorhodopsin and halorhodopsin // *III Europ. bioenerg. conf. Hannover*, 1984. Vol. B. P. 633.
517. Dutton P. L., Prince R. C., Tiede D. M. The reaction center of photosynthetic bacteria // *Photochem. a. Photobiol.* 1978. Vol. 28. P. 939—949.
518. Eddy A. A. Proton-dependent solute transport in microorganisms // *Curr. Top. Membrane. Transp.* 1981. Vol. 10. P. 279—360.
519. Edwards J. T., Rees A. P., Wilson P. M., Morrell S. Measurement of

- the inorganic pyrophosphate in tissues of *Pisum sativum* L // *Planta.* 1984. Vol. 162. P. 188—191.
520. Efron M. B., Guarneri T., Frederiksen J. W., Greene H. L., Weisfeldt M. L. Effect of tris(hydroxymethyl)aminomethane on ischemic myocardium // *Amer. J. Physiol.* 1978. Vol. 235. P. H167—H174.
521. Egger J., Wilson J. Mitochondrial inheritance in a mitochondrially mediated disease // *New Eng. J. Med.* 1983. Vol. 309. P. 142—146.
522. Ehrenstein B. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers // *Quart. Rev. Biophys.* 1978. Vol. 10. P. 1—34.
523. Ehring R., Beyereuther K., Wright J. K., Overath P. In vitro and in vivo products of *E. coli* lactose permease gene are identical // *Nature.* 1980. Vol. 283. P. 537—540.
524. Eisenbach M., Adler J. Bacterial cell envelopes with functional flagella // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 8807—8814.
525. Eisenberg E. S., Mandel L. J., Kaback H. R., Miller M. H. Quantitative association between electrical potential across the cytoplasmic membrane and early gentamicin uptake and killing in *Staphylococcus aureus* // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 157. P. 863—867.
526. Eisenberg P., Okamura M. Y., Feher G. The electron structure of Fe^{2+} in reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. II. Extended X-ray fine structure studies // *Biophys. J.* 1982. Vol. 37. P. 525—538.
527. Ekiel I., Jarrell K. F., Sprott G. D. Amino acid biosynthesis and sodium-dependent transport in *Methanococcus voltae*, as revealed by $[^{13}C]$ -NMR // *Europ. J. Biochem.* 1985. Vol. 149. P. 437—444.
528. Eleff S., Kennaway N. G., Buist N. R. M., Darley-Usmar V. M., Capaldi R. A., Bank W. J., Chance B. $[^{31}P]$ -NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K_3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 3529—3533.
529. Eljerink M. G. L., Hellingwerf K. J., Nano F. E., Kaplan S., Konings W. N. The lactose carrier of *Escherichia coli* functionally incorporated in *Rhodospseudomonas sphaeroides* obeys the regulatory conditions of the phototrophic bacterium // *FEBS. Lett.* 1983. Vol. 64. P. 185—190.
530. Emmerson R., Lewis C. M. The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wave length of light // *Amer. J. Bot.* 1943. Vol. 30. P. 126—139.
531. Emrich H. M., Junge W., Witt H. T. An artificial indicator for electric phenomena in biological membranes and interfaces // *Naturwissenschaften.* 1969. Vol. 56. P. 514.
532. Enequist H. G., Hirst T. R., Harayama S., Hardy S. J., Randall L. L. Energy is required for maturation of exported proteins in *Escherichia coli* // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 116. P. 227—233.
533. Engelhard M., Gerwert K., Hess B., Kreutz W., Siebert F. Light-driven protonation changes of internal aspartic acids of bacteriorhodopsin: an investigation by static and time-resolved infrared difference spectroscopy using $[4-^{13}C]$ aspartic acid labeled purple membrane // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 400—407.
534. Engelhard M., Hess B. Intramolecular proton transfer in bacteriorhodopsin (bR) // *Proc. Conf. on Retinal Proteins (Baykal)* / Ed. Yu. A. Ovchinnikov. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 259—270.
535. Engelhard M., Hess B., Gerwert K., Kohl K. D., Mantel W., Siebert F. Mechanism of proton transfer in bacteriorhodopsin (bR) // *III Europ. Bioenerg. Conf. Hannover*, 1984. Vol. B. P. 635—636.
536. Engelhardt W. A. Ortho- und Pyrophosphat im aeroben und anaeroben Stoffwechsel der Blutzellen // *Biochem. Ztschr.* 1930. Bd. 251. S. 16—21.
537. Engelhardt W. A. Die Beziehungen zwischen Atmung und Pyrophosphatumsatz in Vogelerythrocyten // *Ibid.* 1932. Bd. 251. S. 343—345.

538. *Engelman D. M., Goldman A., Steitz T. A.* The identification of helical segments in the polypeptide chain of bacteriorhodopsin // *Meth. Enzymol.* 1982. Vol. 88. P. 81—88.
539. *Enoch H. G., Heming P. J., Strittmatter P.* Cytochrome b_5 reductase phospholipid vesicles. Interventricular protein transfer and orientation factor in protein-protein interactions // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252. P. 5656—5660.
540. *Epstein W., Laimins L.* Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common control by osmotic forces // *Trends Biochem. Sci.* 1980. Vol. 5. P. 24—23.
541. *Epstein W., Whitelaw V., Hesse J.* A K^+ -transport ATPase in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253. P. 6666—6668.
542. *Erecinska M., Chance B., Wilson D. F.* The oxidation-reduction potential of the copper signal in pigeon heart mitochondria // *FEBS Lett.* 1971. Vol. 16. P. 284—286.
543. *Ernster L., Dallner G., Azzone G. F.* Differential effects of rotenone and antimycin on mitochondrial electron and energy transfer // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. P. 1124—1131.
544. *Ernster L., Ikko S., Luft R.* Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research // *Nature.* 1959. Vol. 184. P. 1851—1854.
545. *Estabrook R. W., Cooper D. Y., Rosenthal O.* The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex // *Biochem. Ztschr.* 1963. Vol. 338. P. 741—755.
546. *Evans M. C. W., Ford R. C.* Evidence for two tightly bound iron-quinones in the electron acceptor complex of photosystem II // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 195. P. 290—294.
547. *Eytan G. D.* Use of liposomes for reconstitution of biological functions // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. Vol. 694. P. 185—202.
548. *Fang J., Jacobs J. M., Kanner B. I., Racker E., Bradshaw R. A.* Amino acid sequence of bovine factor 6 // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 6603—6607.
549. *Farmer S. G.* Noradrenaline and ATP — cotransmitters? // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 10—11.
550. *Fehér G., Okamura M. Y.* Chemical composition and properties of reaction centers // *The photosynthetic bacteria* / Ed. R. K. Clayton, W. R. Sistom. N. Y.: Plenum press, 1978. P. 349—386.
551. *Fein A., Payne R., Corson D. W., Berridge M. J., Irvine R. F.* Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4, 5-triphosphate // *Nature.* 1984. Vol. 311. P. 157—159.
552. *Feldman R. I., Boyer P. D.* The role of tightly bound ADP on chloroplast ATPase // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 13088—13094.
553. *Feldman R. I., Sigman D. S.* The synthesis of enzyme-bound ATP by a soluble chloroplast coupling factor 1 // *Ibid.* 1982. Vol. 257. P. 1676—1683.
554. *Feldman R. I., Sigman D. S.* The synthesis of ATP by the membrane-bound ATP synthase complex from medium $^{32}P_i$ under completely uncoupled conditions // *Ibid.* 1983. Vol. 258. P. 12178—12183.
555. *Ferguson S. J.* Fully delocalized chemiosmotic or localized proton flow pathways in energy coupling? A scrutiny of experimental evidence // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 811. P. 47—95.
556. *Ferretti L., Karnik S. S., Khorana H. G., Nassal M., Oprian D. D.* Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1986. Vol. 83. P. 599—603.
557. *Ferris F. G., Beveridge T. J., Marcean-Day M. L., Larson A. D.* Structure and cell envelope associations of flagellar basal complexes of *Vibrio cholerae* and *Campylobacter fetus* // *Canad. J. Microbiol.* 1984. Vol. 30. P. 322—339.

558. *Fesenko E. E., Kolesnikov S. S., Lubarski A. L.* Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segments // *Nature.* 1985. Vol. 313. P. 310—312.
559. *Fick C., Benz R., Roos N., Brdiczka D.* Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. Vol. 688. P. 429—440.
560. *Finel M., Rubinstein M., Pick U.* Preparation of an ϵ -deficient chloroplast coupling factor 1 having a high ATPase activity // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 166. P. 85—89.
561. *Finel M., Wikström M.* Studies of the role of the oligomeric state and subunit III of cytochrome oxidase in proton translocation // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 851. P. 99—108.
562. *Firgaira F. A., Hendrick J. P., Kalousek F., Kraus J. P., Rosenberg L. E.* RNA required for import of precursor proteins into mitochondria // *Science.* 1984. Vol. 226. P. 1319—1322.
563. *Fischkoff S., Vanderkooi J. M.* Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene // *J. Gen. Physiol.* 1975. Vol. 65. P. 663—676.
564. *Fishkes H., Rudnick V.* Bioenergetics of serotonin transport by membrane vesicles derived from platelet-dense granules // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 5671—5677.
565. *Flagge U. I., Heldt H. W.* Specific labelling of a protein involved in phosphate transport of chloroplasts by pyridoxal-5'-phosphate // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 82. P. 29—33.
566. *Flatmark T., Gronberg M., Husebye E., Berge S. V.* Inhibition by N-ethylmaleimide of the Mg-ATP-driven proton pump of the chromaffin granules // *Ibid.* 1982. Vol. 149. P. 71—74.
567. *Flatmark T., Haavik J., Gronberg M., Kleveland L. J., Wahlstrom S., Berge S. V.* Isolation from the microsomal fraction of rat liver of a subfraction highly enriched in uncoated endocytic vesicles with high H^+ -ATPase activity and a 50 kDa phosphoprotein // *Ibid.* 1985. Vol. 188. P. 272—280.
568. *Flatmark T., Pedersen J. I.* Brown adipose tissue mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.* 1975. Vol. 416. P. 53—103.
569. *Flügge U. I., Hinz G.* Energy dependence of protein translocation into chloroplasts // *Europ. J. Biochem.* 1986. Vol. 160. P. 563—570.
570. *Foissner L.* Inhibitor studies on formation of giant mitochondria in *Nitella flexilis* // *Phyton.* 1983. Vol. 23. P. 19—29.
571. *Forbes M. S., Sperelakis N.* Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function // *Tissue a. Cell.* 1985. Vol. 17. P. 605—648.
572. *Forman N. G., Wilson D. F.* Energetics and stoichiometry of oxidative phosphorylation from NADH to cytochrome c in isolated rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 12908—12915.
573. *Forte J. G., Reenstra W. W.* Plasma membrane proton pumps in animal cells // *BioScience.* 1985. Vol. 35. P. 38—42.
574. *Foster D. L., Boublik M., Kaback H. R.* Structure of the Lac carrier protein of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 31—34.
575. *Foster D. O.* Quantitative contribution of brown adipose tissue thermogenesis to overall metabolism // *Canad. J. Biochem. Cell.* 1984. Vol. 62. P. 618—622.
576. *Foster K. W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M., Kling T., Nakanishi K.* A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eucaryote *Chlamydomonas* // *Nature.* 1984. Vol. 311. P. 756—759.
577. *Fowler L. R., Richardson S. H., Hatefy Y.* A rapid method for the preparation of highly purified cytochrome oxidase // *Biochim. et biophys. acta.* 1962. Vol. 64. P. 170—173.

578. Fox T. D. Five TGA «stop» codons occur within the translated sequence of the yeast mitochondrial gene for cytochrome *c* oxidase subunit II // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 6534—6538.
579. Fox T. D., Leaver C. J. The Zea mays mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons // Cell. 1981. Vol. 26. P. 315—323.
580. Fraenkel G., Friedman S. Carnitine // Vitamins and hormones / Ed. R. S. Harris et al. N. Y.: Acad. press, 1957. Vol. 15. P. 73—118.
581. Frangione B., Rosenwasser E., Penefsky H. S., Pullman M. E. Amino acid sequences of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1981. Vol. 78. P. 7403—7407.
582. Freedman J. A., Lemasters J. J. Thermodynamics of reverse electron transfer across site 1: ATP/2e⁻ is greater than one // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 125. P. 8—13.
583. Freitag H., Janes M., Neupert W. Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion into the outer mitochondrial membrane of Neurospora crassa // Europ. J. Biochem. 1982. Vol. 126. P. 197—202.
584. Friedl P., Hoppe J., Gunsalus R. P., Michelsen O., Von Meyenburg K., Schraier H. U. Membrane integration and function of the three F₀ subunits of the ATP synthase of Escherichia coli K12 // EMBO J. 1983. Vol. 2. P. 99—103.
585. Friedman S., Fraenkel G. Reversible enzymatic acetylation of carnitin // Arch. Biochem. a. Biophys. 1955. Vol. 59. P. 491—501.
586. Friend W. G., Stoffolano J. G. Feeding responses of the horsefly, Tabanus nigrovittatus, to physical factors, ATP analogues and blood fractions // Phys. Entomol. 1984. Vol. 9. P. 395—402.
587. Fritz I. B. The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates // Acta physiol. scand. 1955. Vol. 34. P. 367—385.
588. Fritz I. B. Carnitin and its role in fatty acid metabolism // Adv. Lipid Res. 1963. Vol. 1. P. 285—334.
589. Fry M., Hudson A. T., Randall A. W., Williams R. B. Potent and selective hydroxynaphthoquinone inhibitors of mitochondrial electron transport in Eimeria tenella (apicomplexa: coccidia) // Biochem. a. Pharmacol. 1984. Vol. 33. P. 2115—2122.
590. Futai M., Kanazawa H. Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): Biochemical and molecular biological approaches // Microbiol. Rev. 1983. Vol. 47. P. 285—312.
591. Gabid T. G., Babior B. M. The killing of pathogens by phagocytes // Annu. Rev. Med. 1981. Vol. 32. P. 313—326.
592. Gaffal K. P., Schneider G. J. Numerical, morphological and topographical heterogeneity of the chondriome during the vegetative site cycle of Polytoma papillatum // J. Cell Sci. 1980. Vol. 46. P. 299—312.
593. Ganser A. L., Forte J. G. K⁺-stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oocyte cells // Biochim. et biophys. acta. 1973. Vol. 307. P. 169—179.
594. Garlid K. D., Di Resta D. J., Beavis A. D., Martin W. H. On the mechanism by which dicyclohexylcarbodiimide and quinine inhibit K⁺ transport in rat liver mitochondria // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 1529—1535.
595. Gartner W., Towner P., Hopf H., Oesterheld D. Removal of methyl groups from retinal controls the activity of bacteriorhodopsin // Biochemistry. 1983. Vol. 22. P. 2637—2654.
596. Gasser S. M., Daum G., Schatz G. Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 13034—13041.
597. Gasser S. M., Ohashi A., Daum G., Bohni P. C., Gibson J., Reid G. A., Yonetani T., Schatz G. Imported mitochondrial proteins cytochrome

- b*₂ and cytochrome *c*₁ are processed in two steps // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 267—271.
598. Gast P., Michalski T. J., Hunt J. E., Norris J. R. Determination of the amount and the type of quinones present in single crystals from reaction center protein from the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas viridis // FEBS Lett. 1985. Vol. 179. P. 325—328.
599. Gauthier G. F. On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle // J. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1969. Vol. 95. P. 462—482.
600. Gauthier G. F., Padykula H. A. Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragm // J. Cell Biol. 1966. Vol. 28. P. 333—354.
601. Gennis R. B., Casey R. P., Azzi A., Ludwig B. Purification and characterization of the cytochrome *c* oxidase from Rhodospseudomonas sphaeroides // Europ. J. Biochem. 1982. Vol. 125. P. 189—195.
602. George C. L., Ferguson S. J. Immunochemical identification of a two-subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase from Paracoccus denitrificans // Ibid. 1984. Vol. 143. P. 567—573.
603. George C. L., Ferguson S. J., Cleeter M. W. J., Ragan C. I. Structural relationships between the NADH dehydrogenases of Paracoccus denitrificans and bovine heart mitochondria as revealed by immunological cross-reactivities // FEBS Lett. 1986. Vol. 198. P. 135—139.
604. George R., McElhane R. N. Affinity labeling of the (Na⁺ + Mg²⁺)—ATPase from Acholeplasma laidlawii B membranes by the 2',3'-dialdehyde derivative of adenosine 5'-triphosphate // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 813. P. 161—166.
605. Gerber G. A., Anderegg R. J., Helihi N. C., Gray C. P., Biermann K., Khorana H. G. Partial primary structure of bacteriorhodopsin: sequencing methods for membrane proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 227—231.
606. Geverscer G. A., Lee S.-H. ATP-dependent chloride transport in plasma membrane vesicles from Aplysia intestine // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 816. P. 415—417.
607. Gidding T. H. (Jr.), Staehelin A. Plasma membrane architecture of Anaebaena cylindrica: occurrence of microplasmadesmata and changes associated with heterocyst development and the cell cycle // Cytobiology. 1978. Vol. 16. P. 235—249.
608. Gilbardt M. Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhypphen // Protoplasma. 1969. Bd. 67. S. 413—441.
609. Giordana B., Parenti P., Hanozet G. M., Sacchi V. F. Electrogenic K⁺-basic amino-acid cotransport in the midgut of lepidopteran larvae // J. Membrane. Biol. 1985. Vol. 88. P. 45—53.
610. Glaeser R. M., Jubb J. S., Henderson R. Structural comparison of native and deoxycholate-treated purple membrane // Biophys. J. 1985. Vol. 48. P. 775—780.
- 610a. Glagolev A. N. Reception of the energy level in bacterial taxis // J. Theor. Biol. 1980. Vol. 82. P. 171—185.
- 610b. Glagolev A. N. Bacterial ΔpH⁺-sensing // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. P. 397—400.
611. Glagolev A. N., Skulachev V. P. The proton pump is a molecular engine of motile bacteria // Nature. 1978. Vol. 272. P. 280—282.
612. Glagoleva T. N., Glagolev A. N., Gusev M. V., Nikitina K. A. Proton motive force supports gliding in cyanobacteria // FEBS Lett. 1980. Vol. 117. P. 49—53.
613. Glaser E. G., Crofts A. R. A new electrogenic step in the ubiquinol: cytochrome *c*₂ oxidoreductase complex of Rhodospseudomonas sphaeroides // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 766. P. 322—333.
614. Glaser R. M., Jap B. K. The «Born energy» problem in bacteriorhodopsin // Biochem. J. 1984. Vol. 45. P. 95—97.

615. *Glozzi A., Polandi R., de Rosa M., Gambacorta A.* Artificial black membranes from bipolar lipids of thermophilic archaebacteria // *Biophys. J.* 1982. Vol. 37. P. 563–566.
616. *Glozzi A., Polandi R., de Rosa M., Gambacorta A.* Monolayer black membranes from bipolar lipids of Archaebacterias and their temperature-induced structural changes // *J. Membrane. Biol.* 1983. Vol. 75. P. 45–56.
617. *Gluck S., Connan C., Al-Awgati Q.* Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H^+ pumps into the luminal membrane // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 4327–4331.
618. *Gluck S., Kelly S., Al-Awgati Q.* The proton translocating ATPase responsible for urinary acidification // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 3230–3233.
619. *Glynn I. M., Garrahan P. J.* Driving sodium pump backwards to form adenosine triphosphate // *Nature.* 1966. Vol. 211. P. 1414–1415.
620. *Goffeau A., Boutry M.* Three proton-pumping ATPases in yeast // *Microbiol. Sci.* 1986. Vol. 3. P. 164–167.
621. *Goffeau A., Slayman C. W.* The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. Vol. 639. P. 197–223.
622. *Goglia F., Lanni L. A., Bottiglieri S., Barletta A.* Alteration in hepatic mitochondrial compartment of cold acclimated rats // *Exp. Mol.* 1985. Vol. 44. P. 41–56.
623. *Gogol E. P., Engelman D. M.* Neutron scattering shows that cytochrome b_5 penetrates deeply into the lipid bilayer // *Biophys. J.* 1984. Vol. 46. P. 491–495.
624. *Gohil K., Corbucci G. G., Jones D. A., Harris E. J., Montanaki G., Edwards R. H. T.* Inactivation of mitochondrial function in responses to exercise in man. Possible role of thiol groups // XV FEBS Meet. Abstr. Brussel, 1983. P. 260.
625. *Goldenberg H., Crane F. L., Morre D. J.* Influence of hormones of NADH-dehydrogenase in mouse liver plasma membrane // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1978. Vol. 83. P. 234–240.
626. *Gollnick P. D., King D. W.* Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* 1969. Vol. 216. P. 1502–1509.
627. *Goodman G., Leigh J. S.* Distance between the visible copper and cytochrome a in bovine heart cytochrome oxidase // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 2310–2317.
628. *Gopher A., Gutman M.* The effect of membrane potential on the redox state of cytochrome b_{561} in antimycininhibited submitochondrial particles // *J. Bioenerg. a. Biomembr.* 1980. Vol. 12. P. 349–367.
629. *Gordon J. L.* Extracellular ATP: effects, sources and fate // *Biochem. J.* 1986. Vol. 233. P. 309–319.
630. *Göring H.* Some remarks on the hypothesis «Mechanism of auxin-induced plant cell elongation» published by A. Brummer and W. Parish // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 177. P. 1–6.
631. *Göring H., Bleiss W.* Changes of growth rate and osmotic potential under the influence of decreased pH and IAA // *Plasmalemma and tonoplast: Their function in the plant cell* / Ed. D. Marme et al. Amsterdam: Elsevier Biomed. press, 1982. P. 263–269.
632. *Gottschalk G.* Bacterial metabolism. N. Y.; Heidelberg; Berlin: Springer, 1979. 281 p.
633. *Govindjee R., Ebrey T. G., Crofts A. R.* The quantum efficiency of proton pumping by the purple membrane of Halobacterium halobium // *Biophys. J.* 1980. Vol. 20. P. 231–242.
634. *Gräber P., Rogner M., Buchwald H.-E., Samoray D., Hauska G.* Field-

- driven ATP synthesis by the chloroplast coupling factor complex reconstituted into liposomes // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 145. P. 35–40.
635. *Gräber P., Schlödter S., Witt H. T.* Conformational change of the chloroplast ATPase induced by a transmembrane electric field and its correlation to phosphorylation // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. Vol. 461. P. 426–440.
636. *Graf M., Bokranz M., Bocher R., Friedl P., Kröger A.* Electron transport driven phosphorylation catalyzed by proteoliposomes containing hydrogenase, fumarate reductase and ATP synthase // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 184. P. 100–103.
637. *Granger D. L., Lehninger A. L.* Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells // *J. Cell Biol.* 1982. Vol. 95. P. 527–535.
638. *Grav H. J., Blix A. S.* A source of nonshivering thermogenesis in fur seal skeletal muscle // *Science.* 1979. Vol. 204. P. 87–89.
639. *Green D. E., Tzagoloff A.* The mitochondrial electron transfer chain // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1966. Vol. 116. P. 293–304.
640. *Green D. E., Wharton D. C.* Stoichiometry of the fixed oxidation-reduction components of the electron transfer chain of beef heart mitochondria // *Biochem. Ztschr.* 1963. Vol. 338. P. 335–348.
641. *Green J. C., Hibberd D. J.* The ultrastructure and taxonomy of Diacronema (Prymnesiophyceae) with special reference to the haptonema and flagellar apparatus // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 1977. Vol. 57. P. 1125–1136.
642. *Greene R. V., MacDonald R. E.* Partial purification and reconstitution of the aspartate transport system from Halobacterium halobium // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1984. Vol. 229. P. 576–584.
643. *Greengut S. F., Roseman M. A.* Distribution of cytochrome b_5 between sonicated phospholipid vesicles of different size // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 5883–5886.
644. *Gregor I., Tsugita A.* The amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit IV from Saccharomyces cerevisiae // *Ibid.* 1982. Vol. 257. P. 13081–13087.
645. *Grinius L. L.* Nucleic acid transport driven by ion gradient across cell membrane // *FEBS Lett.* 1980. Vol. 113. P. 1–10.
646. *Grinius L. L.* Proton current and DNA transport // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 551–556.
647. *Grinius L., Berzinskiene J.* Studies on DNA transport during bacterial conjugation. Role of proton motive force-generating H^+ -ATPase and respiratory chain // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 72. P. 151–154.
648. *Grinius L. L., Jasaitis A. A., Kadziauskas J. P., Liberman E. A., Skulachev V. P., Topali V. P., Vladimirova M. A.* Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. I. Submitochondrial particles // *Biochim. et Biophys. acta.* 1976. Vol. 216. P. 1–12.
649. *Grinstein S., Goetz J. D.* Control of free cytoplasmic calcium by intracellular pH in rat lymphocytes // *Ibid.* 1985. Vol. 819. P. 267–270.
650. *Grinstein S., Meulen J. V., Furuya W.* Possible role of H^+ -alkali cation counter-transport in secretory granule swelling during exocytosis // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 148. P. 1–4.
651. *Groma G. I., Szabo G., Varo G.* Direct measurement of picosecond charge separation in bacteriorhodopsin // *Nature.* 1984. Vol. 308. 557–558.
652. *Gromet-Elhanan Z., Khananshvil D., Weiss S., Kanazawa H., Futai M.* ATP-synthesis and hydrolysis by a hybrid system reconstituted from the β -subunit of Escherichia coli F_1 -ATPase and β -less chromatophores of Rhodospirillum rubrum // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 12635–12640.
653. *Grubmeyer C., Penefsky H. S.* Cooperativity between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase // *Ibid.* 1981. Vol. 256. P. 3728–3734.

654. Grünhagen H. H., Witt H. T. Primary ionic events in the functional membrane of photosynthesis. Umbelliferone as indicator for pH changes in one turn-over // *Ztschr. Naturforsch.* 1970. Vol. 25b. P. 373—386.
655. Guerrieri F., Nelson B. D. Studies on the characteristics of a proton pump in phospholipid vesicles inlaid with purified complex III from beef heart mitochondria // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 54. P. 339—342.
656. Guffanti A. A. ATP-dependent Na^+/H^+ antiport activity in *Bacillus alcalophilus* requires generation of an electrochemical gradient of protons // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. Vol. 17. P. 307—310.
657. Guffanti A. A., Bornstein R. F., Krulwich T. A. Oxidative phosphorylation by membrane vesicles from *Bacillus alcalophilus* // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. Vol. 635. P. 619—630.
658. Guffanti A. A., Cohn D. E., Kaback H. R., Krulwich T. A. Relationship between the Na^+/H^+ antiporter and Na^+ / substrate symport in *Bacillus alcalophilus* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1981. Vol. 78. P. 1481—1484.
659. Guffanti A. A., Eisenstein H. C. Purification and characterization of flagella from the alkalophile *Bacillus firmus* RAB // *J. Gen. Microbiol.* 1983. Vol. 129. P. 3239—3242.
660. Guffanti A. A., Susman P., Blanco R., Krulwich T. A. The proton-motive force and α -aminoisobutyric acid transport in an obligately alkalophilic bacterium // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253. P. 708—715.
661. Gulewitsch W. S., Amdiradzhibi S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes // *Ber. Dt. Chem. Ges.* 1900. Bd. 33. S. 1902—1903.
662. Gulewitsch W., Krimberg R. Über Carnitin // *Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chem.* 1905. Vol. 45. P. 326—330.
663. Gutknecht J. Proton/hydroxide conductance through lipid bilayer membranes // *J. Membrane Biol.* 1984. Vol. 82. P. 105—112.
664. Gutman M., Nachliel E. Kinetic analysis of protonation of a specific site on a buffered surface of a macromolecular body // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 2941—2946.
665. Gutman M., Nachliel E., Gershon E. Effect of buffer on kinetics of proton equilibration with a protonable group // *Ibid.* P. 2937—2941.
666. Hackett N. R., Braiman M. S., Gilles-Gonzales M.-A., Khorana G. H., Lerch L. B., Kronis K. A., Chao R. Effect of amino acid substitutions on the structure and function of bacteriorhodopsin // *XIII Intern. Congr. Biochem. Abstr.* Amsterdam, 1985. P. 156.
667. Haddock B. A. The genetics of electron transport in *Escherichia coli* // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 459—464.
668. Häder D. P. Signal perception and amplification in photomovement of prokaryotes // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. Vol. 864. P. 107—122.
669. Halfen L. N., Castenholz R. W. Gliding in a blue-green algae: a possible mechanism // *Nature.* 1970. Vol. 225. P. 1163—1165.
670. Halfen L. N., Castenholz R. W. Gliding motility of blue-green algae: *Oscillatoria princeps* // *J. Phycol.* 1971. Vol. 7. P. 133—145.
671. Hamaide F., Kushner D. J., Sprott G. D. Proton motive force and Na^+/H^+ antiport in a moderate halophile // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 156. P. 537—544.
672. Hamaide F., Kushner D. J., Sprott G. D. Proton circulation in *Vibrio costicola* // *Ibid.* 1985. Vol. 161. P. 681—686.
673. Hamaide F., Sprott G. D., Kushner D. J. Energetics of sodium-dependent α -aminoisobutyric acid transport in the moderate halophilic *Vibrio costicola* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 766. P. 77—87.
674. Hamamoto T., Carrasco N., Matsushita K., Kaback H. R., Montal M. Direct measurement of the electrogenic activity of *o*-type cytochrome oxidase from *Escherichia coli* reconstituted into planar lipid bilayers // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 2570—2573.

675. Hamamoto T., Ohno K., Kagawa Y. Net adenosine triphosphate synthesis driven by an external electric field in rat liver mitochondria // *J. Biochem.* 1982. Vol. 91. P. 1759—1766.
676. Hara Y., Yamada J., Nakao M. Proton transport catalyzed by the sodium pump. Ouabain-sensitive ATPase activity and the phosphorylation of Na, K-ATPase in the absence of sodium ions // *Ibid.* 1986. Vol. 99. P. 531—539.
677. Haraux F., Sigalat C., Moreau A., De Kouchkovsky Y. The efficiency of energized protons for ATP synthesis depends on the membrane topography in thylakoids // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 155. P. 248—251.
678. Harbison G. S., Smith S. O., Pardo J. A., Winkel G., Lugtenburg J. Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-*cis*, 15-*syn* and all-*trans*, 15-*anti* retinal Schiff bases // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 1706—1709.
679. Hargreaves A. J., Avila J. Localization and characterization of tubulin-like proteins associated with brain mitochondria: the presence of a membrane-specific isoform // *J. Neurochem.* 1985. Vol. 45. P. 490—496.
680. Hartkumar P., Reeves J. P. The lysosomal proton pump is electrogenic // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 10403—10410.
681. Harlos P., Lee D. A., Stadler H. Characterization of a Mg^{2+} -ATPase and a proton pump in cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata* // *Europ. J. Biochem.* 1984. Vol. 144. P. 441—446.
682. Harnisch U., Weiss H., Sebald W. The primary structure of the iron-sulfur subunit of ubiquinol-cytochrome *c* reductase from *Neurospora* determined by cDNA and gene sequencing // *Ibid.* 1985. Vol. 149. P. 95—99.
683. Harold F. M. Ion currents and physiological functions in microorganisms // *Annu. Rev. Microbiol.* 1977a. Vol. 31. P. 181—203.
684. Harold F. M. Membranes and energy transduction in bacteria // *Curr. Top. Bioenerg.* 1977b. Vol. 6. P. 83—149.
685. Harold F. M. A study on bioenergetics. N. Y.: Freeman, 1986. 577p.
686. Harold F. M., Pavlasova E., Baarda J. R. A transmembrane pH gradient in *Streptococcus faecalis*: origin and dissipation by proton conductors and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide // *Biochim. et biophys. acta.* 1970. Vol. 196. P. 235—244.
687. Harris D. A., Boork J., Baltscheffsky M. Hydrolysis of ATP by the isolated catalytic subunit of the coupling ATPase from *Rhodospirillum rubrum* // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 3876—3883.
688. Harvey W. K., Cioffi M., Dow J. A. T., Wollfensberger M. G. Potassium ion transport ATPase in insect epithelia // *J. Exp. Biol.* 1983. Vol. 106. P. 91—117.
689. Harvey W. K., Cioffi M., Wollfensberger M. G. Portosomes as coupling factors in active ion transport and oxidative phosphorylation // *Amer. Zool.* 1981. Vol. 21. P. 775—791.
690. Hase T., Nakai M., Matsubara H. The N-terminal 21 amino acids of a 70 kDa protein of the yeast mitochondrial outer membrane direct *E. coli* β -galactosidase into the mitochondrial matrix space in yeast cells // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 197. P. 199—203.
691. Hatefy Y., Haavik A. G., Griffiths D. E. Studies of the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q-reductase // *J. Biol. Chem.* 1962a. Vol. 237. P. 1676—1680.
692. Hatefy Y., Haavik A. G., Griffiths D. E. Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q(QH)₂-cytochrome *c* reductase // *Ibid.* 1962b. Vol. 237. P. 1681—1685.
693. Hauska G., Samoray D., Orlich G., Nelson N. Reconstitution of photosynthetic energy conservation. II. Photophosphorylation in liposomes containing photosystem I reaction center and chloroplast coupling factor // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 111. P. 535—543.
694. Hauska G. A., McCarty R. E., Olson J. S. The relation of the light-

- induced increase in absorbance at 518 nm to photophosphorylation in digitonin subchloroplast particles // FEBS Lett. 1970. Vol. 7. P. 151—156.
695. Hay R., Böhni P., Gasser S. How mitochondria import proteins // Biochim. et biophys. acta, 1984. Vol. 779. P. 65—87.
 696. Hayashi F., Amakawa T. Light-mediated breakdown of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in isolated rod outer segments of frog photoreceptor // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1985. Vol. 128. P. 954—959.
 697. Hayashi M., Unemoto T. FAD and FMN flavoproteins participate in the sodium-transport respiratory chain NADH: quinone reductase of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* // FEBS Lett. 1986. Vol. 202. P. 327—330.
 698. Haydar N. A., Conn H. L., Afifi A., Nakid N., Bellas S., Fawaz K. Severe hypermetabolism with primary abnormality of skeletal muscle mitochondria // Ann. Intern. Med. 1971. Vol. 74. P. 548—558.
 699. Haynes L., Yau K. W. Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones // Nature. 1985. Vol. 317. P. 61—64.
 700. Hearst L. E., Sauer K. Protein sequence homologies between portions of the L and M subunit of reaction centers of *Rhodospseudomonas capsulata* and the Q_B-protein of chloroplast thylakoid membranes; a proposed relation to quinone-binding sites // Ztschr. Naturforsch. C 1984. Vol. 39. P. 421—424.
 701. Heaton G. M., Wagenvoort R. J., Kemp A., Nicholls D. G. Brown adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation // Europ. J. Biochem. 1978. Vol. 72. P. 515—521.
 702. Heefner D. L., Harold F. M. ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis* // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 2798—2802.
 703. Heikel T. A. J., Lathe G. H. The effect of 17 α -ethinyl-substituted steroids on adenosine triphosphatase of rat liver plasma membrane // Biochem. J. 1970. Vol. 118. P. 187—189.
 704. Heinemeier W., Alt J., Herrmann R. G. Nucleotide sequence of the clustered genes for apocytochrome *b₆* and subunit 4 of the cytochrome *b_f* complex in the spinach plastid chromosome // Curr. Genet. 1984. Vol. 8. P. 543—549.
 705. Heldt H. W., Rapley P. Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyl acetonephosphate and of dicarboxylates across the inner membrane of spinach chloroplasts // FEBS Lett. 1970. Vol. 10. P. 143—148.
 706. Henderson R. The purple membrane from *Halobacterium halobium* // Annu. Rev. Biophys. a. Bioeng. 1977. Vol. 6. P. 87—109.
 707. Henderson R. Structure of a bacterial photosynthetic reaction centre // Nature. 1985. Vol. 318. P. 598—599.
 708. Henderson R., Baldwin J. M., Downing K. H., Lepault J., Zemlin F. Structure of purple membrane from *Halobacterium halobium*: recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5 Å resolution // Ultramicroscopy. 1986. Vol. 19. P. 147—178.
 709. Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy // Nature. 1975. Vol. 257. P. 29—32.
 710. Hennig J., Herrmann R. G. Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operon in a phylogenetically conserved arrangement // Mol. a. Gen. Genet. 1986. Vol. 203. P. 117—128.
 711. Herrmann R. G., Alt J., Schiller B., Widger W. R., Cramer W. A. Nucleotide sequence of the gene for apocytochrome *b₅₅₉* on the spinach plastid chromosomes: implications for the structure of the membrane protein // FEBS Lett. 1984. Vol. 176. P. 239—244.
 712. Hesketh T. R., Moore J. P., Morris J. D. H., Taylor M. V., Rogers J.,

- Smith G., Metcalfe J. C. A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells // Nature. 1985. Vol. 313. P. 481—484.
713. Hess B., Kuschmitz D., Engelhard M. Bacteriorhodopsin // Membranes and transport / Ed N. A. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 2. P. 309—318.
 714. Hesse J. E., Wiczorek L., Altendorf K., Reicin A. S., Dobus E., Epstein W. Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1984. Vol. 81. P. 4746—4750.
 715. Hicks D. B., Yocum C. F. Properties of the cyanobacterial coupling factor ATPase from *Spirulina platensis*. I. Electrophoretic characterization and reconstitution of photophosphorylation // Arch. Biochem. a. Biophys. 1986. 245. P. 220—229.
 716. Hildebrand E., Dencher N. Two photosystems controlling behavioral responses of *Halobacterium halobium* // Nature. 1975. Vol. 257. P. 46—48.
 717. Hildebrand E., Schimz A. Consecutive formation of sensory photosystems in growing *Halobacterium halobium* // Photochem. a. Photobiol. 1983. Vol. 38. P. 593—597.
 718. Hill B. S., Hill A. E. ATP-driven chloride pumping and ATPase activity in the limonum salt gland // J. Membrane Biol. 1973. Vol. 12. P. 145—158.
 719. Hill R. Oxygen production by isolated chloroplasts // Proc. Roy. Soc. London. B 1939. Vol. 127. P. 192—210.
 720. Hill R., Bendall F. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis // Nature. 1960. Vol. 186. P. 136—137.
 721. Hilpert W., Dimroth P. Purification and characterization of a new sodium-transport decarboxylase. Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella alcalencens* // Europ. J. Biochem. 1983. Vol. 132. P. 579—587.
 722. Hilpert W., Dimroth P. Reconstitution of Na⁺ transport from purified methylmalonyl-CoA decarboxylase and phospholipid vesicles // Ibid. 1984. Vol. 138. P. 579—583.
 723. Hilpert W., Schink B., Dimroth P. Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na⁺ as coupling ion // EMBO J. 1984. Vol. 3. P. 1665—1680.
 724. Himms-Hagen J. Sympathetic regulation of metabolism // Pharmacol. Rev. 1967. Vol. 19. P. 367—461.
 725. Himms-Hagen J., Desautels M. A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold by an increase in binding // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1978. Vol. 83. P. 628—634.
 726. Himms-Hagen J., Triandafillou J., William C. G. Brown adipose tissue of cafeteria-fed rats // Amer. J. Physiol. 1981. Vol. 241. P. 116—120.
 727. Hinkle P. C. Coupling ratios of proton transport in mitochondria // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 49—58.
 728. Hinkle P. C., Kim J., Racker E. Ion transport and respiratory control in vesicles formed from cytochrome oxidase and phospholipid // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 1338—1339.
 729. Hirota N., Imae Y. Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1 // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 10577—10581.
 730. Hirota N., Kitada M., Imae Y. Flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* are powered by an electrochemical potential gradient of Na⁺ // FEBS Lett. 1981. Vol. 132. P. 278—280.
 731. Hochachka P. W., Mommsen T. P. Protons and anaerobiosis // Science. 1983. Vol. 219. P. 1391—1397.
 732. Hoffman H.-P., Avers C. J. Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell // Ibid. 1973 Vol. 181. P. 749—751.

733. Hojeberg B., Rydström J. Purification and molecular properties of re-constitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase from beef heart mitochondria // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1977. Vol. 78. P. 1183—1190.
734. Holten D., Windsor M. W., Parson W. W., Thornber J. P. Primary photochemical processes in isolated reaction centers of Rhodospseudomonas viridis // Biochim. et biophys. acta. 1978. Vol. 501. P. 112—126.
735. Hopfer U. Transport in isolated plasma membranes // Amer. J. Physiol. 1978. Vol. 234. P. 89—96.
736. Hoppe J., Friedl G., Schairer H. U., Sebald W., Von Meyenburg K., Jorgensen B. B. The topology of the proton translocating F_0 component of the ATP synthase from E. coli. K12: studies with proteases // EMBO J. 1983. Vol. 2. P. 105—110.
737. Hoppe J., Schairer H. U., Friedl P., Sebald W. An Asp—Asn substitution in the proteolipid subunit of the ATP synthase from Escherichia coli leads to a non-functional proton channel // FEBS Lett. 1982. Vol. 145. P. 21—24.
738. Hoppe J., Schairer H. U., Sebald W. The proteolipid of a mutant ATPase from Escherichia coli defective in H^+ -conduction contains a glycine instead of the carboximidreactive aspartyl residue // Ibid. 1980. Vol. 109. P. 107—111.
739. Hoppe J., Sebald W. The conducting F_0 -part of bacterial ATP synthases // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 768. P. 1—27.
740. Horwich A. L., Fenton W. A., Williams K. R., Kalousek F., Krause J. P., Doolittle R. F., Konigsberg W., Rosenberg L. E. Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase // Science. 1984. Vol. 224. P. 1068—1074.
741. Hoshi T., Himukai M. Na^+ -coupled transport of organic solutes in animal cells // Transport and bioenergetics in biomembranes // Ed. R. Sato, Y. Kagawa. N. Y.; L. Tokyo Plenum press, 1982. P. 111—135.
742. Houstek H., Pavelka S., Kopecky J., Palmieri G., Drahotka Z. Specific labelling of mitochondrial phosphate translocator by [^{14}C]-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) // Vectorial reactions in electron and ion transport in mitochondria and bacteria / Ed. F. Palmieri et al. Amsterdam; N. Y.: Oxford: Elsevier, 1981. P. 303—306.
743. Hsieh C.-L., El-Sayed M. A., Nicol M., Nagumo M., Lee J.-M. Time-resolved resonance Raman spectroscopy of the bacteriorhodopsin photocycle on the picosecond and nanosecond time scales // Photochem. a. Photobiol. 1983. Vol. 38. P. 83—94.
744. Huang K.-S., Radhakrishnan H., Bayley H., Khorana H. G. Orientation of retinal in bacteriorhodopsin as studied by cross-linking using a photosensitive analog of retinal // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 13616—13629.
745. Hudig H., Drews G. Characterization of a b-type cytochrome c oxidase of Rhodospseudomonas capsulata // FEBS Lett. 1982. Vol. 146. P. 389—392.
746. Hudig H., Drews G. Reconstitution of b-type cytochrome oxidase from Pseudomonas capsulata in liposomes and turnover studies of proton translocation // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 765. P. 171—177.
747. Hurt E. C., Pesold-Hurt B., Schatz G. The aminoterminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix // EMBO J. 1984. Vol. 3. P. 3149—3156.
748. Hurt E. C., Van Loon A. P. G. M. How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments // Trends Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 204—207.
749. Hurt E. C., Van Loon A. P. G. M., Schatz G. Mitochondrial presequences contain signals of different functions: information for targeting

- precursor to mitochondria, for proteolytic-processing and for intramitochondrial sorting // XVII FEBS Meet. Abstr. Albufeira. 1985. P. 50.
750. Hurwich A. L., Kalousek F., Mellman I., Rosenberg L. E. A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 1129—1135.
751. Hüther F.-J., Kadenbach B. Specific effects of ATP on the kinetics of reconstituted bovine heart cytochrome c oxidase // FEBS Lett. 1986. Vol. 207. P. 89—94.
752. Hutton J. C. The internal pH and membrane potential of the insulin-secretory granule // Biochem. J. 1982. Vol. 204. P. 171—178.
753. Hutton J. C., Peshavaria M. Proton translocating Mg^{2+} -dependent ATPase activity in insulin-secretory granules // Biochem. J. 1982. Vol. 204. P. 161—170.
754. Imae Y., Matsukura H., Kobayashi S. Sodium-driven flagellar motors of alkalophilic Bacillus // Meth. Enzymol. 1986. Vol. 125. P. 582—592.
755. Imae Y., Sato R. Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1986. Vol. 22. P. 620—626.
756. Ingledew W. J., Cobley J. G. A potentiometric and kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown Thiobacillus ferrooxidans // Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol. 590. P. 141—158.
757. Ingledew W. J., Ohnishi T. An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria // Biochem. J. 1980. Vol. 186. P. 111—117.
758. Isaev P. I., Liberman E. A., Samuilov V. D., Skulachev V. P., Tsolina L. M. Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. III. Chromatophores of Rhodospirillum rubrum // Biochim. et biophys. acta. 1970. Vol. 216. P. 22—29.
759. Ise W., Haiker H., Wiess H. Mitochondrial translocation of subunit of the rotenone-sensitive NADH: ubiquinone reductase in Neurospora crassa // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 2075—2080.
760. Itoh S. Absorbance changes of carotenoids and bacteriochlorophylls responding to the changes of local electrical field induced by hydrophobic anion tetraphenylborate in membranes of photosynthetic bacteria // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 766. P. 464—471.
761. Itsumi P., Tanabe H., Nakamoto Y., Kawamukai M., Sakai H., Hime-no M., Komano T., Hirota N. Inhibitory effect of adenosine 3',5'-phosphate on cell division of Escherichia coli K-12 mutant derivatives // J. Bacteriol. 1981. Vol. 147. P. 1105—1109.
762. Ivanov B. N., Shmeleva V. I., Ovehinnikova V. I. Stoichiometry of proton uptake in isolated pea chloroplasts under different light intensities // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1985. Vol. 17. P. 239—253.
763. Iwasa T., Takao M., Yamada M., Tsujimoto K., Tokunaga F. Properties of an analogue pigment of bacteriorhodopsin synthesized with naphthylretinal // Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 838—843.
764. Jackson J. B., Crofts A. R. The high-energy state in chromatophores from Rhodospseudomonas sphaeroides // FEBS Lett. 1969. Vol. 4. P. 185—189.
765. Jackson J. B., Crofts A. R. The kinetics of light induced carotenoid changes in Rhodospseudomonas sphaeroides and their relation to electrical field generation across the chromatophore membrane // Europ. J. Biochem. 1971. Vol. 18. P. 120—130.
766. Jagendorf A. T., Uribe E. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1966. Vol. 55. P. 170—177.
767. James T. W., Bohman R. Proliferation of mitochondria during the cell cycle of the human cell line (HL-60) // J. Cell Biol. 1981. Vol. 89. P. 256—260.

768. Jansky L. Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 1973. Vol. 48. P. 85—132.
769. Jap B. K., Maestre M. F., Kayward S. B., Glaeser R. M. Peptide-chain secondary structure of bacteriorhodopsin // Biophys. J. 1983. Vol. 43. P. 81—89.
770. Jarausch J., Kadenbach B. Structure of the cytochrome *c* oxidase complex of rat liver. 2. Topological orientation of polypeptides in the membrane as studied by proteolytic digestion and immunoblotting // Europ. J. Biochem. 1985. Vol. 146. P. 219—225.
771. Jarosh R. Aktiv bewegungsfähige Plasmaelemente und Chloroplasten. Rotation bei characeen // Oesterr. Akad. Wiss. Math. Naturwiss. Kl. Sitzungsber. Abt. 1956. Bd. 1. S. 58—60.
772. Jarrell K. F., Sprott G. D. Importance of sodium to the bioenergetic properties of *Methanococcus voltae* // Canad. J. Microbiol. 1985. Vol. 31. P. 851—855.
773. Jasaitis A. A., Krivickiene Z. J. Kinetic characteristics and physiological significance of the intermembrane electron transfer in mitochondria // I Europ. bioenerg. conf. Bologna, 1980. P. 111—112.
774. Jasaitis A. A., Nemecek I. B., Severina I. I., Skulachev V. P., Smirnova S. N. Membrane potential generation by two reconstituted mitochondrial systems: liposomes inlaid with cytochrome oxidase or with ATPase // Biochim. et biophys. acta. 1972. Vol. 275. P. 485—490.
775. Jaworowski A., Mayo G., Shaw D. C., Campbell H. D., Young I. G. Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in *ndh* mutant membrane vesicles // Biochemistry. 1981. Vol. 20. P. 3621—3628.
776. Jinks D. C., Silvis J. S., McElhaney R. N. Physiological role and membrane lipid modulation of the membrane-bound (Mg^{2+} - Na^{+})-adenosine triphosphatase activity in *Acholeplasma laidlawii* // J. Bacteriol. 1978. Vol. 136. P. 1027—1036.
777. Johannes H. Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien. II. Die Inturbanz der Färbung mit Rhodaminen // Protoplasma. 1941. Bd. 36. S. 181—194.
778. Johansson B. Brown fat: a review // Metabol. Clin. Exp. 1959. Vol. 8. P. 221—239.
779. Johnson L. V., Summerhayes I. C., Chen L. B. Decreased uptake and retention of rhodamine 123 by mitochondria in feline Sarcoma virus-transformed mink cells // Cell. 1982. Vol. 28. P. 7—14.
780. Johnson L. V., Walsh M. L., Bockus B. J., Chen L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy // J. Cell Biol. 1981. Vol. 88. P. 526—535.
781. Johnson L. V., Walsh M. L., Chen L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1980. Vol. 77. P. 990—994.
782. Johnson M. A., Turnbull D. M., Dick D. J., Sherrat H. S. Partial deficiency of cytochrome *c* oxidase in a human mitochondrial myopathy // XV FEBS Meet. Abstr. Brussel. 1983. P. 260.
783. Johnson P., Fedyna J. S., Schindzidorz A., Smith C. M., Kasvinsky P. J. Regulation of muscle phosphorylase activity by carnosine and anserine // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 109. P. 769—775.
784. Joliot P., Joliot A. Proton pumping and electron transfer in the cytochrome *b*/f complex of algae // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 849. P. 211—222.
785. Jones A. J., Smith M. L., Allison W. S., Laikind P. K., Greene A. A., Schneider J. A. Proton-translocating ATPase and lysosomal cystine transport // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 11727—11730.
786. Jones D. P. Effect of mitochondrial clustering on O_2 supply in hepatocytes // Amer. J. Physiol. 1984. Vol. 247. P. C83—C89.

787. Jones M. R., Beechey R. B. Uncoupler resistance in *E. coli* // Biochem. Soc. Trans. 1986. Vol. 14. P. 744—745.
788. Joshi S., Torok K. Identification of the 29 000 dalton protein and its relevance to oligomycin-sensitive [^{32}P]-ATP exchange in bovine heart electron transport particles // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 12742—12748.
789. Joyard J., Douce R. Mn^{2+} -dependent ATPase of the envelope of spinach chloroplasts // FEBS Lett. 1975. Vol. 51. P. 335—340.
790. Jubb J. S., Worcester D. L., Crespi H. L., Zaccai G. Retinal location in purple membrane of *Halobacterium halobium*: A neutron diffraction study of membranes labelled in vivo with deuterated retinal // EMBO J. 1984. Vol. 3. P. 1455—1462.
791. Junge W., McLaughlin S. The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement // Biochim. et biophys. acta. 1987. Vol. 890. P. 1—5.
792. Junge W., Rumberg B., Schröder H. The necessity of an electric potential difference and its use for photophosphorylation in short flash groups // Europ. J. Biochem. 1970. Vol. 14. P. 575—581.
793. Junge W., Schmid R. The mechanism of action of valinomycin on the thylakoid membrane. Characterization of the electric current density // J. Membrane Biol. 1971. Vol. 4. P. 179—192.
794. Junge W., Witt H. T. On the ion transport system of photosynthesis — investigations on a molecular level // Ztschr. Naturforsch. B. 1968. Vol. 23. P. 244—254.
795. Kaback H. R. The Lac carrier protein in *Escherichia coli* // J. Membrane Biol. 1983. Vol. 76. P. 95—112.
796. Kaddie F. M., Barajas L. Three-dimensional reconstruction of *Pityrosporum* yeast cells based on serial section electron microscopy // J. Ultrastruct. Res. 1969. Vol. 29. P. 260—275.
797. Kadenbach B. Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1986. Vol. 18. P. 39—54.
798. Kadenbach B., Ungibauer M., Jarausch J., Buge U., Kuhn-Nantwig L. The complexity of respiratory complexes // Trends Biochem. Sci. 1983. Vol. 7. P. 398—400.
799. Kagawa Y. H^{+} -ATP synthetase from a thermophilic bacterium // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 421—434.
800. Kagawa Y. Properties of isolated subunits of H^{+} -ATPase // Membranes and transport / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.: L.: Plenum Press, 1982. P. 439—446.
801. Kagawa Y. A new model of proton motive ATP synthesis: acid-base cluster hypothesis // J. Biochem. 1984 a. Vol. 95. P. 295—298.
802. Kagawa Y. Proton motive ATP synthesis // Bioenergetics / Ed. L. Ernster. Amsterdam; N. Y., Oxford: Elsevier, 1984b. P. 149—157.
803. Kagawa Y., Ide C., Hamamoto T., Rogner M., Sone N. Reconstitution of stable proteoliposomes capable of energy transduction // Cell Surface Rev. 1982. Vol. 8. P. 138—159.
804. Kagawa Y., Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing [^{32}P]-adenosine triphosphate exchange // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246. P. 5477—5487.
805. Kakinuma Y., Harold F. M. ATP-driven exchange of Na^{+} for K^{+} ions by *Streptococcus faecalis* // Ibid. 1985. Vol. 260. P. 2086—2091.
806. Kakinuma Y., Ohsumi Y., Anraku Y. Properties of H^{+} -translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae* // Ibid. 1981. Vol. 256. P. 10859—10863.
807. Kakinuma Y., Unemoto T. Sucrose uptake is driven by the Na^{+} electrochemical potential in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163. P. 1293—1295.

808. Kalasauskaite E., Grinius L. The role of energy-yielding ATPase and respiratory chain at early stages of bacteriophage T4 infection // FEBS Lett. 1979. Vol. 99. P. 287—291.
809. Kalasauskaite E., Grinius L., Kadisaite D., Jasaitis A. Electrochemical H⁺ gradient but not phosphate potential is required for Escherichia coli infection by phase T4 // Ibid. 1980. Vol. 117. P. 233—236.
810. Kalasauskaite E., Kadisaite D., Daugelavichius R., Grinius L. L., Yasaitis A. A. Studies on energy supply for genetic processes: requirement for membrane potential in Escherichia coli // Europ. J. Biochem. 1983. Vol. 130. P. 123—130.
811. Kalckar H. The nature of phosphoric esters formed in kidney extracts // Biochem. J. 1939. Vol. 33. P. 631—641.
812. Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state // J. Membrane Biol. 1979. Vol. 49. P. 105—121.
813. Kanako M., Yamaguchi A., Sawai T. Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in Escherichia coli // FEBS Lett. 1985. Vol. 193. P. 194—198.
814. Kanazawa H., Hama H., Rosen B. P., Futai M. Deletion of seven amino acid residues from the γ subunit of Escherichia coli H⁺—ATPase causes total loss of F₁ assembly on membranes // Arch. Biochem. a. Biophys. 1985. Vol. 241. P. 364—370.
815. Kandrash A., Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXXIX. Reconstitution of the third segment of oxidative phosphorylation // J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248. P. 5841—5847.
816. Kanner B. I. Bioenergetics of neurotransmitter transport // Biochim. et Biophys. acta. 1983. Vol. 726. P. 293—316.
817. Kapoor C. L., Chader G. J. Endogenous phosphorylation of retinal photoreceptor outer segment proteins by calcium phospholipid-dependent protein kinase // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 122. P. 1397—1403.
818. Kara-Ivanov M. Nonuniform lateral distribution of transmembrane Δ pH as related to its curvature // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1983. Vol. 15. P. 111—119.
819. Karlovsky P., Dadak V. Tetraphenylborate—sensitive electrode for measuring membrane potential // Folia Microbiol. 1982. Vol. 27. P. 460—464.
820. Kates M., Yengoyan L. S., Sastry P. S. A diether analog of phosphatidyl glycerophosphate in Halobacterium cutirubrum // Biochim. et biophys. acta. 1965. Vol. 98. P. 252—268.
821. Kaunitz J. D., Gunther R. D., Sachs G. Characterization of an electrogenic ATP and chloride-dependent proton translocating pump from rat renal medulla // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 11567—11573.
822. Kaupp U. B., Koch K. -W. Mechanism of photoreception in vertebrate vision // Trends Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 43—47.
823. Kauppinen R. Proton electrochemical potential of the inner mitochondrial membrane in isolated perfused rat hearts, as measured by exogenous probes // Biochim. et Biophys. acta. 1983. Vol. 725. P. 131—137.
824. Kayushin L. P., Skulachev V. P. Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating $\Delta\psi$ and Δ pH // FEBS Lett. 1974. Vol. 39. P. 39—42.
825. Kean E. A., Gutman M., Singer T. P. Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246. P. 2346—2353.
826. Keegstra K., Werner-Washburne M., Cline K., Andrews J. The chloroplast envelope: is it homologous with the double membranes of mito-

- chondria and gram-negative bacteria? // J. Cell. Biochem. 1984. Vol. 24. P. 55—68.
827. Keister D. L., Yike N. J. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD⁺ reduction by Rhodospirillum rubrum chromatophores // Arch. Biochem. a. Biophys. 1967. Vol. 121. P. 415—422.
828. Keister D. L., Yike N. J. Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of Rhodospirillum rubrum // Biochemistry. 1967. Vol. 6. P. 3847—3857.
829. Keith A. D., Snipes W. Viscosity of cellular protoplasm // Science. 1974. Vol. 183. P. 666—668.
830. Keith C. H., Ratan R., Maxfield F. R., Bajer A., Shelanski M. L. Local cytoplasmic calcium gradients in living mitotic cells // Nature. 1985. Vol. 316. P. 848—850.
831. Ken-Dror S., Avi-Dor Y. Regulation of respiration by Na⁺ and K⁺ in the halotolerant bacterium, Ba₁ // Arch. Biochem. a. Biophys. 1985. Vol. 243. P. 238—245.
832. Ken-Dror S., Lanyi J. K., Schobert B., Silver B., Avi-Dor Y. An NADH: quinone oxidoreductase of halotolerant bacterium Ba₁ is specifically dependent on sodium ions // Ibid. 1986. Vol. 244. P. 766—772.
833. Ken-Dror S., Preger R., Avi-Dor Y. Functional characterization of the uncoupler-insensitive Na⁺ pump of the halotolerant bacterium, Ba₁ // Ibid. P. 122—127.
834. Ken-Dror S., Shnaiderman R., Avi-Dor Y. Uncoupler-stimulated Na⁺ pump and its possible role in the halotolerant bacterium, Ba₁ // Ibid. 1984. Vol. 229. P. 640—649.
835. Kennedy E. P. The lactose permease system of Escherichia coli // The lactose operon / Ed. J. R. Beckwith, D. Zipser. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1970. P. 49.
836. Kennedy E. P., Lehninger A. L. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria // J. Biol. Chem. 1949. Vol. 179. P. 957.
837. Kennedy F. G., Jones D. P. Oxygen dependence of mitochondrial function in isolated rat cardiac myocytes // Amer. J. Physiol. 1986. Vol. 250. P. C374—C383.
838. Kepes A., Meeury J., Robin A. The potassium exit pathway in Escherichia coli and its metabolic regulation // XV FEBS Meet. Abstr. Brussels, 1983. P. 29.
839. Khan S., Berg H. C. Isotope and thermal effects in chemiosmotic coupling to the flagellar motor of Streptococcus // Cell. 1983. Vol. 32. P. 913—919.
840. Khan S., Macnab R. M. The steady-state counterclockwise / clockwise ratio on bacterial flagellar motors is regulated by proton motive force // J. Mol. Biol. 1980. Vol. 138. P. 599—614.
841. Khan S., Meister M., Berg H. C. Constraints on flagellar rotation // Ibid. 1985. Vol. 184. P. 645—656.
842. Khanna G., Devoe L., Brown L., Niven D. F., MacLeod R. A. Relationship between ion requirement for respiration and membrane transport in marine bacterium // J. Bacteriol. 1984. Vol. 157. P. 59—63.
843. Khorana H. G. Bacteriorhodopsin and rhodopsin: site-specific mutagenesis in structure-function studies // XIII Intern. Biochem. Congr. Abstr. Amsterdam, 1985. P. 625.
844. Khorana H. G., Braiman M., Chao R., Doi T., Flitsch S., Gilles-Gonzales M., Hackett N., Karnik S., Magi T., Nassal M., Stem L. Recent work on bacteriorhodopsin // XVII FERS Meet. Abstr. West Berlin, 1986. P. 38.

845. Khorana H. G., Ferretti L., Karnik S., Nassal N., Oprian D. D. Total synthesis of a bovine rhodopsin gene // XIII Intern. Congr. Biochem. Amsterdam, 1985. P. 156.
846. Khorana H. G., Gerber G. A., Herlihy W. C., Gray C. P., Anderegg R. J., Nihey K., Biermann K. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 5046—5050.
847. Kielley W. W., Brank J. R. Oxidative phosphorylation in some extracts of rat liver mitochondria // Biochim. et biophys. acta. 1957. Vol. 23. P. 448—449.
848. Kimura K., Mason T. L., Khorana H. G. Immunological probes for bacteriorhodopsin. Identification of three distinct antigenic sites on the cytoplasmic surface // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 2859—2867.
849. Kimura Y., Ikegami A., Stoekenius W. Salt and pH-dependent changes of the purple membrane absorption spectrum // Photochem. a. Photobiol. 1984. Vol. 40. P. 641—646.
850. King G. I., Mowery P. C., Stoekenius W., Crespi H. L., Schoenborn B. P. Location of the chromophore in bacteriorhodopsin // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1980. Vol. 77. P. 4726—4730.
851. Kinne-Saffran E., Beauwens R., Kinne R. An ATP-driven proton pump in brush-border membranes from rat renal cortex // J. Membrane Biol. 1982. Vol. 64. P. 67—76.
852. Kinoshita N., Unemoto T., Kobayashi H. Sodiumstimulated ATPase in *Streptococcus faecalis* // J. Bacteriol. 1984. Vol. 158. P. 844—848.
853. Kitada M., Guffanti A. A., Krulwich T. A. Bioenergetic properties and viability of alkalophilic *Bacillus firmus* RAB as a function of pH and Na⁺ contents of incubation medium // Ibid. 1982. Vol. 152. P. 1096—1104.
854. Kitada M., Horikoshi K. Sodium ion-stimulated α [1-¹⁴C] aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic bacillus species // Ibid. 1977. Vol. 131. P. 784—788.
855. Klingenberg M. The ADP-ATP translocation in mitochondrial membrane potential controlled transport // J. Membrane Biol. 1980. Vol. 56. P. 97—105.
856. Klingenberg M., Rottenberg H. Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane // Europ. J. Biochem. 1977. Vol. 73. P. 125—130.
857. Klingenberg M., Schollmeyer P. Redox reactions in mitochondria under the control of ATP // V Intern. Biochem. Congr. Moscow, 1963. P. 46—65.
858. Klingenberg M., Winkler E. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 3087—3092.
859. Klug G. A., Krause J., Ostlund A.-K., Knoll G., Brdiczka D. Alterations in liver mitochondrial function as a result of fasting and exhaustive exercise // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 764. P. 272—282.
860. Knapp E. W., Fischer S. F., Zinth W., Sander M., Kaiser W., Deisenhofer J., Michel H. Analysis of optical spectra from single crystals of Rhodopseudomonas viridis reaction centers // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1985. Vol. 82. P. 8463—8467.
861. Knox B. E., Tsong T. Y. Voltage-driven ATP synthesis by beef heart mitochondrial F₀F₁-ATPase // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 4757—4763.
862. Knutson R. M. Heat production and temperature regulation in eastern skunk cabbage // Science. 1974. Vol. 186. P. 746—747.
863. Kobayashi H., Suzuki T., Kinoshita N., Unemoto T. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH // J. Bacteriol. 1984. Vol. 158. P. 1157—1160.
864. Kodama T., Taniguchi S. Sodium-dependent growth and respiration of a nonhalophilic bacterium *Pseudomonas stutzeri* // J. Gen. Microbiol. 1976. Vol. 96. P. 17—24.
865. Kodama T., Taniguchi S. Sodium-controlled coupling of respiration to energy-linked functions in *Pseudomonas stutzeri* // Ibid. 1977. Vol. 98. P. 503—510.
866. Koepsell H., Korn K., Ferguson D., Menuhr H., Ollig D., Haase W. Reconstitution and partial purification of several Na⁺ transport systems from renal brush-border membranes. Properties of the L-glutamate transporter in proteoliposomes // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 6548—6558.
867. Kohl K. D., Engelhard M., Hess B. Specific requirement of cation for the photocycle of bacteriorhodopsin (BR) // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. B. P. 647—648.
868. Koland J. G., Miller M. J., Gennis R. B. Reconstitution of the membrane-bound, ubiquinone-dependent pyruvate oxidase respiratory chain of *Escherichia coli* with the cytochrome *d* terminal oxidase // Biochemistry. 1984. Vol. 23. P. 445—453.
869. Kolansky D. M., Conboy J. G., Fenton W. A., Rosenberg L. E. Energy-dependent translocation of the precursor of ornithine transcarbamylase by isolated rat liver mitochondria // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 8467—8471.
870. Kolarov J., Hostek J., Kopecky J., Kuzela S. The binding of dicyclohexylcarbodiimide to uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria // FEBS Lett. 1982. Vol. 144. P. 6—10.
871. Kondrashin A. A., Remennikov V. G., Samuilov V. D., Skulachev V. P. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Inorganic pyrophosphatase // Europ. J. Biochem. 1980. Vol. 113. P. 219—222.
872. Konings W. N. Generation of metabolic energy by end-product efflux // Trends Biochem. Sci. 1985. Vol. 10. P. 317—319.
873. Konings W. N., Robillard G. T. Physical mechanism for regulation of proton solute symport in *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 5480—5484.
874. Konstantinov A. A., Kunz W. S., Kamensky Yu. A. The Q cycle in the mitochondrial respiratory chain // Chemiosmotic proton circuits in biological membrane / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.; Addison-Wesley, 1981. P. 123—146.
875. Konstantinov A. A., Ruuge E. K. Semoquinone Q in the respiratory chain of electron transfer particles // FEBS Lett. 1977. Vol. 81. P. 137—141.
876. Konstantinov A. A., Skulachev V. P., Smirnova I. A. Membrane potential generation by submitochondrial particles associated with a lipid-impregnated filter // Ibid. 1980. Vol. 114. P. 302—306.
877. Kopecky J., Guerrieri F., Jezek P., Drahotka Z., Housek J. The nonidentity of proton and chloride conducting pathways in brown adipose tissue (bat) mitochondria // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. B. P. 437—438.
878. Kornberg A. DNA synthesis. San Francisco: Freeman, 1974. 399 p.
879. Kotyk A. Coupling of secondary active transport with $\Delta\mu\text{H}^+$ // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1983. Vol. 15. P. 307—319.
880. Koyama N., Kiyomiya A., Nosoh Y. Na⁺-dependent uptake of amino acids by an alkalophilic bacillus // FEBS Lett. 1976. Vol. 72. P. 77—78.
881. Kozlov I. A., Chernyak B. V. Regulation of H⁺-ATPases in oxidative and photophosphorylation // Trends Biochem. Sci. 1986. Vol. 11. P. 32—35.
882. Krasinskaya N. P., Samuilov V. D. Light-induced generation of electric potential difference in the membranes of purple and green sulfur bacteria // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1977. Vol. 9. P. 171—180.
883. Krauhs J. M., Sordahl L. A., Brown A. M. Isolation of pigmented granules involved in extra-retinal photoreception in *Aplysia californica* neurons // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 471. P. 25—31.

884. Kröger A., Winkler E., Innerhofer A., Hackenberg H., Schagger H. The formate dehydrogenase involved in electron transport from formate to fumarate in *Vibrio succinogenes* // *Europ. J. Biochem.* 1979. Vol. 94. P. 465—475.
885. Kroon A. M., Dontje B. H. J., Holtrop M., Van Den Bogert. The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics // *Cancer Lett.* 1984. Vol. 25. P. 33—40.
886. Krulwich T. A. Na^+/H^+ antiporters // *Biochim. et biophys. acta* 1983. Vol. 726. P. 245—264.
887. Krulwich T. A., Federbush J. G., Guffanti A. A. Presence of a nonmetabolizable solute that is translocated with Na^+ enhances Na^+ -dependent pH homeostasis in an alkalophilic *Bacillus* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 4055—4058.
888. Krulwich T. A., Guffanti A. A., Bornstein R. F., Hoffstein J. A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB // *Ibid.* 1982. Vol. 257. P. 1885—1889.
889. Kuhn N., Kadenbach B. Isolation and properties of cytochrome *c* oxidase from rat liver and quantification of immunological differences between isozymes from various rat tissues with subunit-specific antisera // *Europ. J. Biochem.* 1985. Vol. 149. P. 147—158.
890. Kulaev I. S., Mansurova S. E., Vagabov V. M. Some aspects of studies of the biological role of inorganic polyphosphates and pyrophosphate // *Sovjet scientific review. Sec. D* / Ed. V. P. Skulachev. Amsterdam: OPA, 1982. Vol. 3. P. 57—114.
891. Kunz W. S., Konstantinov A. A. Cytochrome *b* reduction by hexaammineruthenium in mitochondria and submitochondrial particles: evidence for heme b_{552} localization at the M-side of the mitochondrial membrane // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 175. P. 100—104.
892. Kunz W. S., Konstantinov A. A., Tsofin L. M., Liberman E. A. Localization of a ferricyanide-reactive site of cytochrome *b*— c_1 complex, possibly of cytochrome *b* or ubiquinone, at the outer face of submitochondrial particles // *Ibid.* Vol. 172. P. 261—266.
893. Kushner D. J., Hamade F., MacLeod R. A. Development of salt-resistance active transport in a moderately halophilic bacterium // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 153. P. 1163—1171.
894. Kyle D. J. The 32000 dalton Q_B protein of photosystem 2 // *Photochem. a. Photobiol.* 1985. Vol. 41. P. 107—116.
895. Labedan B., Goldberg E. B. Requirement for membrane potential in infection of phage 14 DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1979. Vol. 76. P. 4669—4674.
896. Labedan B., Heller K. B., Jasaitis A. A., Wilson T. H., Goldberg E. B. A membrane potential threshold for phage T4 DNA injection // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1980. Vol. 93. P. 625—630.
897. Labedan B., Letellier L. Energetics of the first steps of phage infection // *J. Bioenerg. a. Biomembr.* 1984. Vol. 16. P. 1—9.
898. Laimins L. A., Rhoads D. B., Altendorf K., Epstein N. Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1978. Vol. 75. P. 3216—3219.
899. Lamb T. D., Simon E. J. Analysis of electrical noise in turtle cones // *J. Physiol.* 1977. Vol. 272. P. 435—468.
900. Lampidis T. J., Bernal S. D., Summerhayes I. C., Chen L. B. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro // *Cancer Res.* 1983. Vol. 43. P. 716—720.
901. Lampidis T. J., Salet C., Moreno G., Chen L. B. Effects of the mitochondrial probe rhodamine 123 and related analogs on the function and viability of pulsating myocardial cells in culture // *Agents and Actions*, 1984. Vol. 14. P. 3—10.

902. Lancaster J. R., Carper S. W., Crider B. P., Gillies K., Rogers K. R. Bioenergetic role of nickel-containing proteins in methanogens // *Frontiers in bioinorganic chemistry* / Ed. A. V. Xavier. N. Y.: VCH Publ., 1987. P. 27—35.
903. Lancaster J. R., Rogers K. R., Crider B. P., Carper S. W., Al-Mahrouq H. A. Unique bioenergetic phenomena in the methanogenic bacteria // *IV Europ. bioenerg. conf. Prague*, 1986. P. 69.
904. Lance P. C. La respiration de l'*Arum maculatum* au cours du développement de l'inflorescence // *Ann. sci. natur. Bot.* 1972. Vol. 12. P. 477—495.
905. Lanyi J. K. Light-dependent *trans* to *cis* isomerization of the retinal in halorhodopsin // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 175. P. 337—342.
906. Lanyi J. K., Schobert B. Effects of chloride and pH on the chromophore and photochemical cycling of halorhodopsin // *Biochemistry*. 1983. Vol. 22. P. 2763—2769.
907. Larreta Garde V., Gellf G., Thomas D. Modification by immobilization of the microenvironment of chromatophores of *Rhodospseudomonas capsulata* // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 116. P. 337—339.
908. Larsen S. H., Adler J., Gargus J. J., Hogg R. W. Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1974. Vol. 71. P. 1239—1243.
909. Larsen S. H., Reader R. W., Kort E. N., Tso W.-W., Adler J. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli* // *Nature*. 1974. Vol. 249. P. 74—77.
910. Laszlo D. J., Fandrich B. L., Sivaram A., Chance B., Taylor B. L. Cytochrome *o* as a terminal oxidase and receptor for aerotaxis in *Salmonella typhimurium* // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 159. P. 663—667.
911. Laszlo D. J., Niwano M., Goral W. W., Taylor B. L. *Bacillus cereus* electron transport and proton motive force during aerotaxis // *Ibid.* P. 820—824.
912. Latellier Z., Labedan B. Release of respiratory control in *Escherichia coli* after bacteriophage adsorption: process independent of NDA injection // *Ibid.* 1985. Vol. 161. P. 179—182.
913. Lawford H. G., Garland P. B. Proton translocation coupled to quinone reduction by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in rat liver and on heart mitochondria // *Biochem. J.* 1972. Vol. 130. P. 1029—1044.
914. Lee C.-P., Ernster L. Equilibrium studies of the energy-dependent and non-energy-dependent pyridine nucleotide transhydrogenase reaction // *Biochim. et biophys. acta*. 1964. Vol. 81. P. 187—190.
915. Lee C.-P., Ernster L. Restoration of oxidative phosphorylation in non-phosphorylating submitochondrial particles by oligomycin // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1965. Vol. 18. P. 523—526.
916. Lee D. C., Hayward J. A., Restall C. J., Chapman D. Second-derivative infrared spectroscopic studies of the secondary structures of bacteriorhodopsin and Ca^{2+} -ATPase // *Biochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 4364—4373.
917. Lee S.-H., Cohen N. S., Jacobs A. J., Brodie A. F. Isolation, purification and reconstitution of a proline carrier protein from *Mycobacterium phlei* // *Ibid.* 1979. Vol. 18. P. 2232—2238.
918. Lee S.-H., Pritchard J. B. Proton-coupled *L*-lysine uptake by renal brush border membrane vesicles from mullet (*Mugil cephalus*) // *J. Membrane Biol.* 1983. Vol. 75. P. 171—178.
919. Lefort M. Cytologie végétale. Modifications du chondriome dans les cellules etiologies de l'*Euglena gracilis* (Klebs) // *C. r. Acad. sci. D.* 1964. Vol. 258. P. 4318—4321.
920. Lehninger A. L. Phosphorylation coupled to oxidation of dihydridophosphopyridine nucleotide // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 190. P. 345—359.
921. Lehninger A. L. The mitochondrion. N. Y.: Benjamin, 1964. 524 p.

922. *Lehninger A. L.* Mitochondria and calcium ion transport // *Biochem. J.* 1970. Vol. 119. P. 129—138.
923. *Lehninger A. L., Hassan M., Sudduth H. C.* Phosphorylation coupled to the oxidation of ascorbic acid by isolated mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1954. Vol. 210. P. 911—922.
924. *Lehninger A. L., Reynafarje B., Alexandre A., Villalobo A.* Proton stoichiometry and mechanisms in mitochondrial energy transduction // *Membrane bioenergetics* / Ed. C. P. Lee et al. L.: Addison-Wesley, 1979. P. 393—404.
925. *Lehninger A. L., Wadkins C. L., Cooper C., Devlin T. M., Gamble J. L.* Oxidative phosphorylation // *Science*. 1958. Vol. 128. P. 450—455.
926. *Leonard K., Hovmoller S., Karlsson B., Wingfield P., Li Y., Perkins S., Weiss H.* The structure of mitochondrial cytochrome reductase // *Vectorial reactions in electron and ion transport in mitochondria and bacteria* / Ed. P. Palmieri et al. Amsterdam: Elsevier, 1981. P. 127—138.
927. *Leung K. H., Hinkle P.* Reconstitution of ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced coenzyme Q-cytochrome *c* reductase and phospholipids // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 8467—8471.
928. *Levitsky D. O.* Effects of palmitoyl carnitine on mitochondria and phospholipid membranes // VII FEBS Meet. Abstr. Varna, 1971. P. 227.
929. *Levitsky D. O., Skulachev V. P.* Carnitine: the carrier transporting fatty acyls into mitochondria by means of an electrochemical gradient of H^+ // *Biochim. et biophys. acta*. 1972. Vol. 275. P. 33—50.
930. *Lew V. L., Glynn I. M., Ellory J. C.* Net synthesis of ATP by reversal of the sodium pump // *Nature*. 1970. Vol. 225. P. 865—866.
931. *Lewis R. N. A. H., McElhaney R. N.* Purification and characterization of the membrane ($Na^+ + Mg^{2+}$)-ATPase from *Acholeplasma laidlawii* B. // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. Vol. 735. P. 113—122.
932. *Li Y., de Vries S., Leonard K., Weiss H.* Topography of the iron-sulphur subunit in mitochondrial ubiquinol: cytochrome *c* reductase // *FEBS Lett.* 1981. Vol. 135. P. 277—280.
933. *Li Y., Leonard K., Weiss H.* Membrane-bound and water-soluble cytochrome *c*₁ from *Neurospora mitochondria* // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 116. P. 199—205.
934. *Liao M.-J., London E., Khorana H. G.* Regeneration of the native bacteriorhodopsin structure from two chymotryptic fragment // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 9949—9955.
935. *Lieberman E. A., Skulachev V. P.* Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. IV. General discussion // *Biochim. et biophys. acta*. 1970. Vol. 216. P. 30—42.
936. *Lieberman E. A., Topali V. P., Tsofin L. M., Jasaitis A. A., Skulachev V. P.* Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // *Nature*. 1969. Vol. 222. P. 1076—1078.
937. *Lichko L. P., Okorokov L. A.* Some properties of membrane-bound, solubilized and reconstituted into liposomes H^+ -ATPase of vacuoles of *Saccharomyces carlsbergensis* // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 174. P. 233—237.
938. *Lichko L. P., Okorokov L. A.* What family of ATPases does the vacuolar H^+ -ATPase belong to? // *Ibid.* 1985. Vol. 187. P. 349—353.
939. *Lin C. S., Klingenberg M.* Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria // *Ibid.* 1980. Vol. 113. P. 299—303.
940. *Lindau M., Hochstrate P., Ruppel H.* Two component fast photo-signals derived from rod outer segment membranes attached to porous cellulose filters // *Ibid.* Vol. 112. P. 17—20.
941. *Lindau M., Ruppel H.* On the nature of the fast light-induced charge displacement in vertebrate photoreceptors // *Photobiochem. a. Photobiophys.* 1985. Vol. 9. P. 43—56.

942. *Brown adipose Tissue* / Ed. O. Lindberg. N. Y., L.: Elsevier, 1970. 241 p.
943. *Lindberg O., Nedergaard L., Cannon B.* Thermogenic mitochondria // *Mitochondria and microsomes* / C. P. Lee et al. Menlo Park (Cal.): Addison-Wesley, 1981. P. 93—119.
944. *Linden M., Andersson G., Gellerfors P., Nelson B. D.* Subcellular distribution of rat liver porin // *Biochim. et Biophys. acta*. 1984. Vol. 770. P. 93—96.
945. *Linden M., Gellerfors P., Nelson B.* Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 141. P. 189—192.
946. *Lindsay J. G., Owen C. S., Wilson D. F.* The invisible copper of cytochrome *c* oxidase // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1975. Vol. 169. P. 492—505.
947. *Linke P., Weiss H.* Reconstitution of mitochondrial ubiquinol: cytochrome *c* reductase from isolated subunits // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 143.
948. *Linker C., Wilson T. H.* Characterization and solubilization of the membrane-bound ATPase of *Mycoplasma galliseptian* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 163. P. 1258—1262.
949. *Lipmann F.* Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy // *Adv. Enzymol.* 1941. Vol. 1. P. 99—107.
950. *Liu C.-L., Hart N., Peck H. D.* Inorganic pyrophosphate: energy source for sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfotomaculum* // *Science*. 1982. Vol. 217. P. 363—364.
951. *Lo K.-M., Jones S. S., Hackett N. R., Khorana H. G.* Specific amino acid substitutions in bacteriophage: Replacement of a restriction fragment in the structural gene by synthetic DNA fragments containing altered codons // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1984. Vol. 81. P. 2285—2289.
- 951a. *Loh Y. P., Tamm W. W. H., Russel J. T.* Measurement of ΔpH and membrane potential in secretory vesicles isolated from bovine pituitary intermediate lobe // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 8238—8245.
952. *Loomis W. F., Lipmann F.* Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation // *Ibid.* 1948. Vol. 173. P. 807—808.
953. *Lopez J. R., Tien H. T.* Reconstitution of photosystem I reaction center into bilayer lipid membranes // *Photobiochem. a. Photobiophys.* 1984. Vol. 7. P. 25—39.
954. *Lopez-Rivas A., Adelberg E. A., Rozengurt E.* Intracellular K^+ and the mitogenic response of 3T3 cells to peptide factors in serum-free medium // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1982. Vol. 79. P. 6275—6279.
955. *Lorusso M., Boffoli D., Bellomo E., Papa S.* Redox-linked proton translocation in the $b-c_1$ complex from beef-heart mitochondria reconstituted into phospholipid vesicles. General characteristics and control flow by $\Delta \mu H^+$ // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 137. P. 405—412.
956. *Löw H., Crane F. L.* Hormone regulated redox function in plasma membranes // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 68. P. 157—159.
957. *Low M. G., Ferguson M. A. G., Futerman A. H., Silman I.* Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1986. Vol. 11. P. 212—215.
958. *Lowe A. G., Jones M. N.* Proton motive force — what price Δp ? // *Ibid.* 1984. Vol. 9. P. 11—12.
959. *Lozier R. H., Niederberger W., Bogomolni R. A.* Kinetics and stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, *Halobacterium halobium* cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane // *Biochim. et biophys. acta*. 1976. Vol. 440. P. 545—556.

960. Lu W.-P., Kelly D. P. Thiosulphate oxidation. Electron transport and phosphorylation in cell-free systems from *Thiobacillus A2* // J. Gen. Microbiol. 1983. Vol. 129. P. 1661—1671.
961. Lubansky H. J., Arruda J. A. L. Plasma membrane proton-ATPase of a turtle bladder epithelial cell line // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 4035—4040.
962. Lucas L. G., Ligeti E., Banki K., Fonyo A. Interrelationships between membrane potential and transport of ions in mitochondria // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984. P. 69.
963. Ludwig B. Heme aa_3 type cytochrome *c* oxidases from bacteria // Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol. 594. P. 177—189.
964. Ludwig B. Cytochrome *c* oxidase in eukaryotes and prokaryotes // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. B. P. 23—24.
965. Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L., Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study // J. Clin. Invest. 1962. Vol. 41. P. 1776—1804.
966. Lundegard H. Absorption, transport and oxidation of inorganic ions by the roots // Ark. bot. A. 1945. Vol. 32. P. 1—139.
967. Lythgoe J. N., Shand J., Foster R. G. Visual pigment in fish iridocytes // Nature. 1984. Vol. 308. P. 83—84.
968. Maccechini M.-L., Rudin V., Blobel G., Schatz G. Import of proteins into mitochondria: Precursor forms of the extramitochondrially made F_1 -ATPase-subunits in yeast // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 343—347.
969. Macnab R. M. Bacterial motility and chemotaxis: the molecular biology of a behavioral system // Crit. Rev. Biochem. 1978. Vol. 5. P. 291—341.
970. Macnab R. M., Koshland D. E. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1972. Vol. 69. P. 2509—2512.
971. Maeda A., Ogurusu T., Yoshizawa T. Resonance raman study on binding of chloride to the chromophore of halorhodopsin // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 2517—2521.
972. Maevsky E. I., Gusar I. B., Rosenfeld A. S., Vdovichenko V. I., Maljuk J. I., Rotenberg Yu. S., Kondrashova M. N. Doesn't succinic acid mediate adrenaline stimulation in mitochondria? // II Europ. bioenerg. conf. Lyon, 1982. P. 589—590.
973. Magee A. I., Schlesinger M. J. Fatty acid acylation of eucaryotic cell membrane proteins // Biochim. et biophys. acta. 1982. Vol. 694. P. 279—289.
974. Maley G. F., Lardy H. A. Phosphorylation coupled with the oxidation of reduced cytochrome *c* // J. Biol. Chem. 1954. Vol. 210. P. 903—910.
975. Maloney P. C., Wilson T. H. The evolution of ion pumps // BioScience. 1985. Vol. 35. P. 43—48.
976. Maltouf A. F., Labedan B. Host cell metabolic energy is not required for injection of bacteriophage T5 DNA // J. Bacteriol. 1983. Vol. 153. P. 124—133.
977. Maltouf A. F., Labedan B. The energetics of the injection process of bacteriophage Lambda DNA and the role of the $ptsM/pel$ -encoded protein // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1985. Vol. 130. P. 1093—1102.
978. Malviya A. N., Anglard P. Modulation of cytosolic protein kinase C activity by ferriocyanide: priming event seems transmembrane redox signalling. A study on transformed C3H/10T1/2 cells in culture // FEBS Lett. 1986. Vol. 200. P. 265—270.
979. Mandel-Hartvig I., Nelson B. D. Comparative study of the peptide composition of complex III (quinol-cytochrome *c* reductase) // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1983. Vol. 15. P. 289—299.

980. Manson M. D., Tedesco P., Berg H. C., Harold F. M., Van Der Drift C. A protonmotive force drives bacterial flagella // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1977. Vol. 74. P. 3060—3064.
981. Manson M. D., Tedesco P. M., Berg H. C. Energetics of flagellar rotation in bacteria // J. Mol. Biol. 1980. Vol. 138. P. 541—561.
982. Mansurova S. E., Shakhov Yu. A., Kulaev I. S. Mitochondrial pyrophosphatase is a coupling factor of respiration and pyrophosphate synthesis // FEBS Lett. 1977. Vol. 74. P. 31—34.
983. Manton I. Electron microscopical observations on a very small flagellate: The problem of *Chromulina pusilla* butcher // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 1959. Vol. 38. P. 319—333.
984. Margolis F. L. An olfactory neuropeptide // Role of peptides in neuronal function / Ed. J. L. Barker, T. Smith. N. Y.: Dekker, 1980. P. 545—572.
985. Margolis F. L., Grillo M., Kawano T., Farbman A. I. Carnosine synthesis in olfactory tissue during ontogeny: effect of exogenous α -alanine // J. Neurochem. 1985. Vol. 44. P. 1459—1464.
986. Marin B. Sensitivity of tonoplast-bound adenosinetriphosphatase from Hevea to inhibitors // Plant Physiol. 1983. Vol. 73. P. 973—977.
987. Marin B., Blasco F. Further evidence for the proton pumping work of tonoplast ATPase from Hevea latex vacuole // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 105. P. 354—361.
988. Marin B., Preisser J., Komor E. Solubilization and purification of the ATPase from the tonoplast of Hevea // Europ. J. Biochem. 1985. Vol. 151. P. 131—140.
989. Marin B., Proverbio T., Proverbio F. Effect of Ca^{2+} on the ouabain-insensitive, active Na^{+} uptake in inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 817. P. 299—306.
990. Marino P. A., Phan K. A., Osborn M. J. Energy dependence of lipopolysaccharide translocation in *Salmonella typhimurium* // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 14965—14970.
991. Maroti P., Kirmaier C., Wraight C., Holtz D., Pearlstein R. M. Photochemistry and electron transfer in borohydride-treated photosynthetic reaction centers // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 810. P. 132—139.
992. Marra E., Ballarin-Denti A. The proton pumps of the plasmalemma and the tonoplast of higher plants // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1985. Vol. 17. P. 1—21.
993. Martin W. H., Beavis A. D., Garlid K. D. Identification of an 82 000 dalton protein responsible for K^{+}/H^{+} antiport in rat liver mitochondria // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 2062—2065.
994. Marvin D. A. Proton currents and protein motion in membranes // FEBS Lett. 1983. Vol. 156. P. 1—5.
995. Mason H. S. Oxidases // Annu. Rev. Biochem. 1965. Vol. 34. P. 595—634.
996. Mates S. M., Eisenberg E. S., Mandel L. J., Patel L., Kaback H. R., Miller M. H. Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus* // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 6693—6697.
997. Matsui H. Na^{+} , K^{+} -ATPase: conformational change and interaction with sodium and potassium ions // Transport and bioenergetics in biomembranes / Ed. R. Sato, Y. Kagawa. Tokyo; N. Y.; L.: Jap. Sci. Soc. press, 1982. P. 165—187.
998. Matsuno-Yagi A., Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin: a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1977. Vol. 78. P. 237—243.

999. Matsushita K., Kaback H. R. D-lactate oxidation and generation of the proton electrochemical gradient in membrane vesicles from *Escherichia coli* GR19N and in proteoliposomes reconstituted with purified D-lactate dehydrogenase and cytochrome *o* oxidase // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 2321—2327.
1000. Matsushita K., Pater L., Gennis R. B., Kaback H. R. Reconstitution of active transport in proteoliposomes containing cytochrome *o* oxidase and lac carrier protein purified from *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1983. Vol. 80. P. 4889—4893.
1001. Matsushita K., Pater L., Kaback H. R. Cytochrome *c* type oxidase from *Escherichia coli*. Characterization of the enzyme and mechanism of electrochemical proton gradient generation // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23. P. 4703—4714.
1002. Matsuura K., Dutton P. L. Flash activated electron and proton translocation through the ubiquinone-cytochrome *c* oxidoreductase of mitochondria and photosynthetic bacteria // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 259—270.
1003. Matsuura S., Shioi J.-I., Imae Y. Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial proton-motive force // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 82. P. 187—190.
1004. Maury J. J., Huber C., Moreland D. E. Effects of magnesium on intact chloroplasts // *Plant Physiol.* 1981. Vol. 68. P. 1257—1263.
1005. Mayer F., Ivey M. D., Ljungdahl L. G. Macromolecular organization of F₁-ATPase isolated from *Clostridium thermoaceticum* as revealed by electron microscopy // *J. Bacteriol.* 1986. Vol. 166. P. 1128—1130.
1006. McCarty D. R., Selman B. R. Partial purification of a nucleoside triphosphatase from the inner membrane of the chloroplast envelope of pea // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1986. Vol. 218. P. 523—531.
1007. McCormack J. G., Denton R. M. Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria // *Trends Biochem. Sci.* 1986. Vol. 11. P. 258—262.
1008. McCoy J. M., Khorana H. G. Introduction and characterization of amber mutations in the bacteriorhodopsin gene // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 8456—8461.
1009. McEnery M. W., Pedersen P. L. Diethylstilbestrol. A novel F₀-directed probe of the mitochondrial proton ATPase // *Ibid.* 1986. Vol. 261. P. 1745—1752.
1010. McFadden G. I., Wethebree R. Serial reconstruction of the mitochondrial reticulum in the antarctic flagellata *Pyramimonas gelidicola* (Prasinophyceae, Chlorophyta) // *Protoplasma* 1982. Vol. 111. P. 79—82.
1011. McLaggan D., Selwyn M. J., Dawson A. P. Interrelationship of Na⁺ fluxes and internal pH acidification in an alkalophile // *III Europ. bioenerg. conf. Hannover*, 1984. Vol. B. P. 495—496.
1012. McLaggan D., Selwyn M. J., Dawson A. P. Dependence on Na⁺ of control of cytoplasmic pH in a facultative alkalophile // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 165. P. 254—258.
1013. McLaughlin S. Uncouplers of oxidative phosphorylation // *Chemiosmotic proton circuits in biological membrane* / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 601—610.
1014. McMurray L., Petrucci R. E., Levy S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1980. Vol. 77. P. 3974—3977.
1015. McMurray W. C., Maley G. F., Lardy H. A. Oxidative phosphorylation by sonic extracts of mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1958. Vol. 230. P. 219—229.
1016. Meeuse B. J. D. Thermogenic respiration in aroids // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1975. Vol. 26. P. 117—126.

1017. Melkonian M., Berns B. Zoospore ultrastructure in the green alga *Freidmannia israelensis*: an absolute configuration analysis // *Protoplasma*. 1983. Vol. 114. P. 67—84.
1018. Mende P., Huther F.-J., Kadenbach B. Specific and reversible activation and inactivation of the mitochondrial phosphate carrier by cardiolipin and nonionic detergents, respectively // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 158. P. 331—334.
1019. Mendiola-Morganthaler L. R., Morganthaler J. J., Price C. A. Synthesis of coupling factor CF₁ protein by isolated spinach chloroplasts // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 62. P. 96—100.
1020. Merrill C. R., Harrington M. G. The search for mitochondrial inheritance of human diseases // *Trends in Genetics*. 1985. Vol. 1. P. 140—144.
- 1020a. Methods in Enzymology. 1979. Vol. 55. pt. F; 1982. Vol. 88. pt. I.
1021. Meury J., Robin A. A high-affinity site for glutathione in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its possible role in potassium retention // *Europ. J. Biochem.* 1985. Vol. 148. P. 113—118.
1022. Meury J., Robin A., Monnier-Champeix P. Turgorcontrolled K⁺ fluxes and their pathways in *Escherichia coli* // *Ibid.* Vol. 151. P. 613—619.
1023. Michel H. Three-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis* // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 158. P. 567—572.
1024. Michel H., Deisenhofer J. X-ray diffraction studies on a crystalline bacterial photosynthetic reaction center: a progress report and conclusions on the structure of photosystem II reaction centers // *Encyclopedia of plant physiology. New series. Photosynthesis III* / Ed. L. A. Staehelin, C. J. Arntzen. Berlin; Heidelberg; N. Y.; Tokyo: Springer, 1986. Vol. 19. P. 371—381.
1025. Michel H., Weyer K.-A., Gruenberg H., Dunger I., Oesterheld D., Lottspeich F. The «light» and «medium» subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequence // *EMBO J.* 1986. Vol. 5. P. 1149—1158.
1026. Michel H., Weyer K.-A., Gruenberg H., Lottspeich F. The «heavy» subunit of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the gene, nucleotide and amino acid sequence // *Ibid.* 1985. Vol. 4. P. 1667—1672.
1027. Michell B. Oncogenes and inositol lipids // *Nature*. 1984. Vol. 308. P. 770.
1028. Michels M., Bakker E. P. Generation of a large protonophore-sensitive proton motive force and pH difference in the acidophilic bacteria *Thermoplasma acidophilum* and *Bacillus acidocaldarium* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 231—237.
1029. Michelsen O., Meyenburg K. von. The function of the I-protein of the ATP-synthase operon of *Escherichia coli* // *III Europ. bioenerg. conf. Hannover*, 1984. Vol. B. P. 609.
1030. Midgley M., Iscandar N. S., Dawes E. A. The interaction of phosphonium ions with *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the operation of an efflux system // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. Vol. 856. P. 45—49.
1031. Mileykovskaya E. I., Abuladze A. N., Kormer S. S. Peculiarities of the structure and catalytic properties of H⁺-ATPase from the anaerobic bacterium *Lactobacillus casei* // *IV Europ. bioenerg. conf. Prague*, 1986. P. 262.
1032. Mileykovskaya E. I., Tikhonova G. V., Kondrashin A. A., Kozlov I. A. Membrane-reversible H⁺-ATPase from *Micrococcus lysodeikticus* // *Europ. J. Biochem.* 1971. Vol. 62. P. 613—617.
1033. Miller A. G., Turpin D. H., Canvin D. T. Na⁺ requirement for growth, photosynthesis, and pH regulation in the alkalotolerant cyanobacterium *Cynechococcus liopolensis* // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 159. P. 100—106.

1034. Miller J. B., Koshland D. E. Sensory electrophysiology of bacteria: relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in *Bacillus subtilis* // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1977. Vol. 74. P. 4752—4756.
1035. Miller K. R., Staehelin L. A. Analysis of the thylakoid outer surface coupling factor is limited to unstacked membrane regions // J. Cell Biol. 1976. Vol. 68. P. 30—47.
1036. Miller M. H., Edberg S. C., Mandel L. J., Behar C. F., Steigbigel N. H. Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside-resistant small-colony mutants of *Staphylococcus aureus* // Antimicrob. Agents Chemother. 1980. Vol. 18. P. 722—729.
1037. Miller M. J., Gennis R. B. The purification and characterization of the cytochrome *d* terminal oxidase of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 9159—9165.
1038. Miller M. J., Gennis R. B. The cytochrome *d* complex is a coupling site in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* // Ibid. 1985. Vol. 260. P. 14003—14008.
1039. Minkov I. B., Vasilyeva E. A., Fitin A. F., Vinogradov A. D. Differential effects of ADP on ATPase and oxidative phosphorylation in submitochondrial particles // Biochem. Intern. 1980. Vol. 1. P. 478—485.
1040. Mitchell P. Transport of phosphate across the surface of *Micrococcus pyogenes*: Nature of the cell inorganic phosphate // J. Gen. Microbiol. 1953. Vol. 9. P. 273—287.
1041. Mitchell P. Transport of phosphate across the osmotic barrier of *Micrococcus pyogenes*: specificity and kinetics // Ibid. 1954. Vol. 11. P. 73—82.
1042. Mitchell P. Hypothetical thermokinetic and electrokinetic mechanisms of locomotion in microorganisms // Proc. Roy. Phys. Soc. Edinburgh, 1956. Vol. 25. P. 32—34.
1043. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism // Nature. 1961. Vol. 191. P. 144—148.
1044. Mitchell P. Molecule group and electron translocation through natural membranes // Biochem. Soc. Symp. 1963. Vol. 22. P. 142—169.
1045. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Biol. Rev. 1966 a. Vol. 41. P. 445—502.
1046. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Bodmin: Glynn Res., 1966b. 192 p.
1047. Mitchell P. Chemiosmotic coupling and energy transduction. Bodmin: Glynn res., 1968. 111 p.
1048. Mitchell P. Self-electrophoretic locomotion in microorganisms; bacterial flagella as giant ionophores // FEBS Lett. 1972. Vol. 28. P. 1—5.
1049. Mitchell P. Cation translocating adenosine triphosphatase models: how direct is the participation of adenosine triphosphate and its hydrolysis products in cation translocation // Ibid. 1973. Vol. 33. P. 267—274.
1050. Mitchell P. Proton translocating mechanisms and energy transduction by adenosine triphosphatases: an answer to criticism // Ibid. 1975a. Vol. 50. P. 95—97.
1051. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c₁* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle // Ibid. 1975b. Vol. 56. P. 1—6.
1052. Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation // Ibid. 1975c. Vol. 59. P. 137—139.
1053. Mitchell P. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems // J. Theor. Biol. 1976. Vol. 62. P. 327—367.
1054. Mitchell P. A commentary of alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation // FEBS Lett. 1977. Vol. 78. P. 1—20.

1055. Mitchell P. Bacterial flagellar motors and osmoelectric molecular rotation by an axially transmembrane well and turnstile mechanism // Ibid. 1984. Vol. 176. P. 287—294.
1056. Mitchell P. Molecular mechanics of protonmotive F_0F_1 —ATPases. Rolling well and turnstile hypothesis // Ibid. 1985. Vol. 182. P. 1—8.
1057. Mitchell P., Mitchell R., Moody A. J., West I. C., Baum H., Wrigglesworth J. M. Chemiosmotic coupling in cytochrome oxidase. Possible protonmotive O loop and O cycle mechanisms // Ibid. Vol. 188. P. 1—7.
1058. Mitchell P., Moyle J. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria // Nature. 1965. Vol. 208. P. 147—151.
1059. Mitchell P., Moyle J. Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria // Biochem. J. 1967a. Vol. 104. P. 588—600.
1060. Mitchell P., Moyle J. Proton-transport phosphorylation: some experimental tests // Biochemistry of mitochondria / Ed. E. C. Slater et al. N. Y.: Acad. press, 1967b. P. 53—74.
1061. Mitchell P., Moyle J. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria // Biochem. J. 1967c. Vol. 105. P. 1147—1162.
1062. Mitchell P., Moyle J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristall membrane of rat liver mitochondria // Europ. J. Biochem. 1969. Vol. 7. P. 471—484.
1063. Mitchell P., Moyle J. The mechanism of proton translocation in reversible proton-translocating adenosine triphosphatases // Biochem. Soc. Spec. Suppl. 1974. Vol. 4. P. 91—111.
1064. Mitchell R., West I. C., Moody A. J., Mitchell P. Measurement of the proton-motive stoichiometry of the respiratory chain of rat liver mitochondria: the effect of N-ethylmaleimide // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 849. P. 229—235.
1065. Mochizuki-Oda N., Oosawa F. Amiloride-sensitive $Na^+ - H^+$ antiporter in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 163. P. 395—397.
1066. Mokhova E. N., Skulachev V. P., Zhigacheva I. V. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 501. P. 415—423.
1067. Moldeus J. W., Cho Y.-N., Cinti D. L., Schenkman J. B. Hepatic organelle interaction. III. Mitochondrial modification of microsomal drug metabolism // J. Biol. Chem. 1973. Vol. 248. P. 8574—8584.
1068. Montgomery R. I., Spach P. J., Cunningham C. C. Effect of chronic ethanol consumption on the liver mitochondrial ATP synthase // Fed. Proc. 1984. Vol. 43. P. 1878.
1069. Moolenaar W. H., Tertoolen L. G. J., De Laat S. W. Phorbol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH // Nature. 1984. Vol. 312. P. 371—374.
1070. Moore A. L., Rich P. R. The bioenergetics of plant mitochondria // Trends Biochem. Sci. 1980. Vol. 5. P. 284—288.
1071. Moore C., Pressman B. C. Mechanism of action of valinomycin on mitochondria // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1964. Vol. 15. P. 562—567.
1072. More B. F., Husain I., Nyren P., Baltscheffsky M. Synthesis of pyrophosphate coupled to the reverse energylinked transhydrogenase reaction in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores // FEBS Lett. 1986. Vol. 200. P. 133—138.
1073. Moreadith R., Batshaw M., Ohnishi T., Reynafarje B., Lehninger A. L. Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) deficiency in an infant with congenital lactic acidosis // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. B. P. 499.
1074. Morel F., Doussiere J., Stasia M.-J., Vignais P. V. The respiratory burst of bovine neutrophils. Role of a b type cytochrome and coenzyme Q specificity // Europ. J. Biochem. 1985. Vol. 152. P. 669—679.

1075. Moriyama Y., Takano T., Ohkuma S. Proton translocation ATPase in lysosomal membrane ghosts. Evidence that alkaline Mg^{2+} -ATPase acts as a proton pump // J. Biochem. 1984. Vol. 95. P. 995—1007.
1076. Morschel E., Staehelin L. A. Reconstitution of cytochrome f/b_6 and CF_0 - CF_1 ATP synthetase complexes into phospholipid and galactolipid liposomes // J. Cell Biol. 1983. Vol. 97. P. 301—310.
1077. Moser C. C., Matsushita K., Robertson D. E., Kaback H. R., Dutton P. L. Kinetics of electron transfer in reaction center-cytochrome c proteoliposomes // FEBS Lett. 1986. Vol. 194. P. 115—120.
1078. Moss D. A., Bendall D. S. Cyclic electron transport in chloroplasts, the Q-cycle and the site of action of antimycin // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 767. P. 389—395.
1079. Moyle J., Mitchell P. The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria // Biochem. J. 1973. Vol. 132. P. 571—585.
1080. Mueller P., Rudin D. O. Development of K^+ , Na^+ discrimination in experimental bimolecular lipid membranes by macrocyclic antibiotics // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1967. Vol. 26. P. 398—410.
1081. Müller M., Moser R., Cheneval D., Carafoli E. Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 3839—3843.
1082. Miller V., Blaut M., Gottschalk G. Generation of a transmembrane electrochemical gradient of Na^+ in *Methanosarcina barkeri* // Eur. J. Biochem. 1987. Vol. 162. P. 461—466.
1083. Murata N. Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum* // Biochim. et biophys. acta. 1969. Vol. 172. P. 242—251.
1084. Murphy D. J. The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants // Ibid. 1986. Vol. 864. P. 33—94.
1085. Nabadryk E., Tiede D. M., Dutton P. L., Bretton J. Conformation and orientation of the protein in the bacterial photosynthetic reaction center // Ibid. 1982. Vol. 682. P. 273—280.
1086. Nachliel E., Gutman M. Kinetic analysis of proton transfer between reactants adsorbed to the same micelle. The effect of proximity on the rate constants // Europ. J. Biochem. 1984. Vol. 143. P. 83—88.
1087. Nagi M., Cook L., Prasad M. R., Cinti D. L. Site of participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal fatty acid chain elongation // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 14823—14828.
1088. Nagy K. A., Odell D. K., Seymour R. S. Temperature regulation by the inflorescence of *Philodendron* // Science. 1972. Vol. 178. P. 1195—1197.
1089. Nakashima R. A., Mangan P. S., Colombini M., Pedersen P. L. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N' -dicyclohexylcarbodiimide-labelling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC // Biochemistry. 1986. Vol. 25. P. 1015—1021.
1090. Nalecz M. J., Casey R. P., Azzi A. Structural and functional alterations induced in the mitochondrial cytochrome $b-c_1$ complex by N,N' -dicyclohexylcarbodiimide // Biochimie. 1983. Vol. 65. P. 513—518.
1091. Nass M. M. K. Analysis of methylglyoxal bis(guanyldrazone)-induced alterations of hamster tumor mitochondria by correlated studies of selective rhodamine binding, ultrastructural damage, DNA replication, and reversibility // Cancer Res. 1984. Vol. 44. P. 2677—2688.
1092. Nathans J., Thomas D., Hogness D. S. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments // Science. 1986. Vol. 232. P. 193—202.
1093. Nedergaard J., Cannon B. Thermogenic mitochondria // Bioenergetics / Ed. L. Ernster. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 291—314.

1094. Nedergaard J., Raasmaja A., Cannon B. Parallel increases in amount of $[^3H]$ -GDP binding and thermogenin antigen in brown-adipose-tissue mitochondria of cafeteria-fed rats // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 122. P. 1328—1336.
1095. Negrin R. S., Forster D. L., Fillingame R. H. Energy-transducing H^+ -ATPase of *Escherichia coli*. Reconstitution of proton-translocation activity of the intrinsic membrane sector // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 5643—5648.
1096. Nelson B. D. The composition, structure, topology and function of complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase) // Mitochondria and microsomes / Ed. C. P. Lee et al. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 217—248.
1097. Nelson N., Cidon S. New molecular aspects of energy-transducing protein complexes // J. Bioenerg. a. Biomembr. 1984. Vol. 16. P. 11—36.
1098. Nelson N., Hauska G. Topography, resolution and reconstitution of the chloroplast membrane // Membrane bioenergetics / Ed. C. P. Lee et al. L.: Addison-Wesley, 1979. P. 189—202.
1099. Nelson N., Schatz G. Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 4365—4369.
1100. Netzker R., Kochel H. G., Basak N., Kuntzel H. Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6, cytochrome oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNA // Nucl. Acid. Res. 1982. Vol. 10. P. 4783—4794.
1101. Neupert W. Biosynthesis of mitochondrial membrane proteins // XVII Spec. FEBS Meet. Abstr. Albufeira. 1985. P. 50.
1102. Newman M. J., Wilson T. H. Solubilization and reconstitution of the lactose transport system from *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 10583—10586.
1103. Nguyen T. D., Siegenthaler P.-A. Purification and some properties of an Mg^{2+} , Ca^{2+} - and calmodulin-stimulated ATPase from spinach chloroplast envelope membranes // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 840. P. 99—106.
1104. Nicholls D. G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria // FEBS Lett. 1976. Vol. 61. P. 103—110.
1105. Nicholls D. G. Brown adipose tissue mitochondria // Biochim. et biophys. acta. 1979. Vol. 549. P. 1—22.
1106. Nicholls D. G. Bioenergetics. Introduction to the chemiosmotic theory. L.: N. Y.: Acad. press, 1982. 190 p.
1107. Nicholls D. G., Locke R. M. Heat generation by mitochondria // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 567—576.
1108. Nicholls D. G., Locke R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat // Physiol. Rev. 1984. Vol. 64. P. 1—64.
1109. Nicholls D. G., Snelling R., Rial E. Proton and calcium circuits across the mitochondrial inner membrane // Biochem. Soc. Trans. 1984. Vol. 12. P. 388—390.
1110. Nicholls P. The proteoliposome — is it a defective enzyme test bed? // Liposome letters / Ed. A. D. Bangham. L.: N. Y.: Acad. press, 1983. P. 215—230.
1111. Nikaido H., Rosenberg E. Y. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins // J. Bacteriol. 1983. Vol. 153. P. 241—252.
1112. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion // Nature. 1984. Vol. 308. P. 693—698.
1113. Njus D. The chromaffin vesicle and the energetics of storage organelles // J. Auton. Nerv. Syst. 1983. Vol. 7. P. 35—40.
1114. Njus D., Zallakian M., Knoth J. The chromaffin granule: proton-cycling in the slow lane // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes

- nes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 365—374.
1115. Norris R. E. Prasinophytes // *Phytoflagellates. Developments in marine biology* / Ed. E. R. Cox. N. Y.; Amsterdam: Elsevier, 1980. Vol. 2. P. 85—147.
1116. Novak B., Laszlo E. Mitochondrial alternative respiration in the cell cycle // *Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung.* 1984. Vol. 19. P. 149—156.
1117. Novgorodov S. A., Yaguzhinsky L. S. Ion transport in rat liver mitochondria: the effect of the incubation medium osmolarity // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 183. P. 47—51.
1118. Nylund A., Komarova N. J., Rumyantsev P. P., Tjonneland A., Okland S. Heart ultrastructure in *Peterobius brevistylis* (Archaeognatha: Microcoryphia) // *Entomol. Gener.* 1986. Vol. 11. P. 263—272.
1119. Nyren P., Baltscheffsky M. Inorganic pyrophosphate-driven ATP-synthesis in liposomes containing membrane-bound inorganic pyrophosphatase and F_0-F_1 complex from *Rhodospirillum rubrum* // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 155. P. 125—130.
1120. Nyren P., Hajnal K., Baltscheffsky M. Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 566. P. 630—635.
1121. Oberg S. G., Robinovitch M. R. ATP-induced lysis of rat parotid secretory granules: possible role of ATP in exocytotic release // *J. Supramol. Struct.* 1980. Vol. 13. P. 235—304.
1122. Oesterhelt D. The light-driven anion pump halorhodopsin // XIII Intern. Biochem. Congr. Abstr. Amsterdam, 1985. P. 626.
1123. Oesterhelt D. Functions, genes and structures of halobacterial photoreceptors // XVII FEBS Meet. Abstr. West Berlin, 1986. P. 33.
1124. Oesterhelt D., Gottschlich R., Hartmann R., Michel H., Wagner G. Light energy conversion in halobacteria // *Symp. Sci. Gen. Microbiol.* 1977. Vol. 27. P. 333—349.
1125. Oesterhelt D., Hagemann P., Tittor J. The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. II. Quantum yields and a kinetic model // *EMBO J.* 1985. Vol. 4. P. 2351—2356.
1126. Oesterhelt D., Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* // *Nature.* 1971. Vol. 233. P. 149—152.
1127. Oesterhelt D., Stoekenius W. Functions of a new photoreceptor membrane // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1973. Vol. 70. P. 2853—2857.
1128. Oesterhelt D., Stoekenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane // *Meth. Enzymol.* 1974. Vol. 31. P. 667—678.
1129. Ogarusu T. A., Maeda A., Sasaki N., Yoshizawa T. Effects of chloride on the absorption spectrum and photoreactions of halorhodopsin // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. Vol. 682. P. 446—451.
1130. Ogata T., Murata F. Cytological features of three fiber types in human striated muscle // *Tohoku J. Exp. Med.* 1969. Vol. 99. P. 225—245.
1131. Ogata T., Yamasaki J. Scanning electronmicroscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers // *Cell a. Tissue Res.* 1985. Vol. 241. P. 251—256.
1132. Ohashi A., Gibson J., Gregor I., Schatz G. Import of proteins into mitochondria. The precursor of cytochrome c_1 is processed in two steps, one of them heme-dependent // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 13042—13047.
1133. Ohnishi I., Harmon H. J., Waring A. J. Electronparamagnetic—resonance studies on the spatial relationship of redox components in cytochrome oxidase // *Biochem. Soc. Trans.* 1985. Vol. 13. P. 607—611.

1134. Ohnishi T., Lo Brutto R., Salezno J. C., Bruckner R. C., Frey T. G. Spatial relationship between cytochrome a and a_3 // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 14821—14825.
1135. Ohta S., Kagawa Y. Human F_1 -ATPase: molecular cloning of cDNA for the beta subunit // *J. Biochem.* 1986. Vol. 99. P. 135—141.
1136. Okamura M. Y., Feher G., Nelson N. Reaction centers // *Photosynthesis: Energy conservation by plants and bacteria* / Ed. O. D. Govindjee. N. Y. Acad. press, 1982. Vol. 1. P. 195—272.
1137. Okamura M. Y., Steiner L. A., Feher G. Characterization of reaction centers from photosynthetic bacteria. I. Subunit structure of the protein mediating the primary photochemistry in *Rhodospseudomonas sphaeroides* R-26⁺ // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13. P. 1394—1403.
1138. Okorokov L. A., Lichko L. P. The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 155. P. 102—106.
1139. Ono H., Ito A. Evidence for participation of the inner membrane in the import of sulfite oxidase into the intermembrane space of liver mitochondria // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1982. Vol. 107. P. 258—264.
1140. Orlich G., Hauska G. Reconstitution of photosynthetic energy conservation // *Europ. J. Biochem.* 1980. Vol. 111. P. 525—533.
1141. Ort D. R., Parson W. W. Flash-induced volume changes of bacteriorhodopsin-containing membrane fragments and their relationship to proton movements and absorbance transients // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253. P. 6158—6164.
1142. Osafune T. Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and «concentric lamellar bodies» formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* (L) in synchronous culture // *J. Electron. Microsc.* 1973. Vol. 22. P. 51—61.
1143. Otto R., Sonneberg A. S. M., Veldkamp H., Konings W. N. Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1980. Vol. 77. P. 5502—5506.
1144. Ovchinnikov Yu. A. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels // *Europ. J. Biochem.* 1979. Vol. 94. P. 321—336.
1145. Ovchinnikov Yu. A. Structure-topographic analysis of bacteriorhodopsin by means of proteolytic enzymes // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 311—320.
1146. Ovchinnikov Yu. A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 248. P. 179—191.
1147. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview // *Ibid.* 1979. Vol. 100. P. 219—224.
1148. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Kiselev A. V., Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P. The water-exposed C-terminal sequence of bacteriorhodopsin does not affect H^+ -pumping // *Ibid.* 1986. Vol. 194. P. 16—20.
1149. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Vasilov R. G., Vturina I. Yu., Kuryatov A. B., Kiselev A. V. The antigenic structure and topography of bacteriorhodopsin in purple membranes as determined by interaction with monoclonal antibodies // *Ibid.* 1985. Vol. 179. P. 343—349.
1150. Ovchinnikov Yu. A., Demin V. V., Barnakov A. N., Kuzin A. P., Lunev A. V., Modyanov N. N., Dzhandzhugazyan K. N. Three-dimensional structure of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase revealed by electron microscopy of two-dimensional crystals // *Ibid.* 1990. P. 73—76.
1151. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Broude N., Petrukhin K. E., Grishin A. V., Arzamazova N. M., Aldanova N. A., Monastyrskaya G. F.,

- Sverdlov E. D. Pig kidney Na^+ , K^+ -ATPase. Primary structure and spatial organization // *Ibid.* 1986. Vol. 201. P. 237-245.
1152. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Kostetsky P. V., Trubetskaya O. E., Hundal T., Ernster L. Oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) of beef heart mitochondria. Internal sequence homology and structural relationship with other proteins // *Ibid.* 1984. Vol. 175. P. 109-112.
1153. Ovchinnikov Yu. A., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Aldanova N. A., Trubetskaya O. E., Nazimov I. V., Hundal T., Ernster L. Amino acid sequence of the oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) of beef-heart mitochondria and its homology with the δ -subunit of the F_1 -ATPase of *Escherichia coli* // *Ibid.* Vol. 166. P. 19-22.
1154. Ozawa T. Mitochondrial electron transport system // Transport and bioenergetics in biomembranes / Ed. R. Sato, Y. Kagawa. Tokyo; N. Y.; L.: Jap. Sci. Soc. press: Tokyo Plenum press, 1982. P. 1-36.
1155. Ozols J., Carr S. A., Strittmatter P. Identification of the NH_2 -terminal blocking group of NADH-cytochrome b_5 reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 13349-13354.
1156. Packham N. K., Berriman J. A., Jackson J. B. The charging capacitance of the chromatophore membrane // *FEBS Lett.* 1978. Vol. 89. P. 205-210.
1157. Padan E., Zilberstein D., Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. Vol. 650. P. 151-166.
1158. Pages J. M., Lazdunski C. Maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. Requirement for energy, site and kinetics of processing // *Europ. J. Biochem.* 1982. Vol. 124. P. 561-566.
1159. Paillotin G., Vermeglio A., Breton J. Orientation of reaction center and antenna chromatophores in the photosynthetic membrane of *Rhodospseudomonas viridis* // *Biochim. et biophys. acta.* 1979. Vol. 545. P. 249-264.
1160. Palacios-Romero R., Mowbray J. Evidence for the rapid control both in vivo and in vitro of the efficiency of oxidative phosphorylation by 3, 5, 3'-tri-iodo-L-thyronine in rats // *Biochem. J.* 1977. Vol. 184. P. 527-538.
1161. Pande S. V., Blanchaer M. C. Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246. P. 402-411.
1162. Pande S. V., Parvin R. Characterization of carnitine-acylcarnitine translocase system of heart mitochondria // *Ibid.* 1976. Vol. 251. P. 6683-6691.
1163. Pande S. V., Parvin R. Carnitine-acylcarnitine translocase catalyzes an equilibrating unidirectional transport as well // *Ibid.* 1980. Vol. 255. P. 2994-3001.
1164. Panov A., Filippova S., Lyakhovich V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability for H^+ and K^+ ions // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1980. Vol. 199. P. 420-426.
1165. Panov A. V., Konstantinov Yu. M., Lyakhovich V. V. The possible role of palmitoyl-CoA in the regulation of the adenine nucleotides transport in mitochondria under different metabolic states // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1975. Vol. 7. P. 75-85.
1166. Papadimitriou A., Neustein H. B., Dimauro S., Stanton R., Bresolin N. Histiocytoid cardiomyopathy of infancy: deficiency of reducible cytochrome b in heart mitochondria // *Pediatr. Res.* 1984. Vol. 18. P. 1023-1028.
1167. Pappin D. J. C., Eliopoulos E., Brett M., Findlay J. B. C. A structural model for ovine rhodopsin // *Intern. J. Biol. Macromol.* 1984. Vol. 6. P. 73-76.

1168. Paradies H. H., Schmidt U. D. Size and molecular parameters of adenosine triphosphatase from *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 5257-5263.
1169. Parson W. W. Photosynthetic bacterial reaction centers: interactions among the bacteriochlorophylls and bacteriopheophytins // *Annu. Rev. Biophys. a. Bioenerg.* 1982. Vol. 11. P. 57-80.
1170. Parson W. W., Ke B. Primary photochemical reactions // Photosynthesis: energy conversion by plants and bacteria / Ed. O. D. Govindjee. N. Y.: Acad. press, 1982. Vol. 1. P. 331-385.
1171. Passarella S., Marra E., Atlante A., Doonan S., Quagliariello E. The role of metal ions in the uptake of aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase into isolated rat liver mitochondria in vitro // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 189. P. 235-240.
1172. Passarella S., Marra E., Doonan S., Languino L. R., Saccone C., Quagliariello E. Uptake of aspartate aminotransferase into mitochondria in vitro depends on the transmembrane pH gradient // *Biochem. J.* 1982. Vol. 202. P. 353-362.
1173. Pastushenko V. F. Theory of self-electrophoretic mechanism of bacterial movement // *Bioelectrochem. a. Bioenerg.* 1975. Vol. 2. P. 52-60.
1174. Paulin J. J. The chondrion of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 66. P. 404-413.
1175. Pedersen P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells // Progress in experimental tumor research / Ed. D. P. H. Walzlach. Basel: Karger, 1978. Vol. 22. P. 190-274.
1176. Pedersen P. L., Amzel L. M. Structure of ATPases of the F_0F_1 type: chemical asymmetry and implications for mechanism // Achievement and perspectives of mitochondrial research. Vol. 1. Bioenergetics / Ed. E. Quagliariello et al. Amsterdam: Elsevier, 1985. P. 169-189.
1177. Pedersen P. L., Wehrle J. P. Phosphate transport processes of animal cells // Membranes and transport / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 645-669.
1178. Penefsky H. S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1985. Vol. 82. P. 1589-1593.
1179. Pennington R. M., Fisher R. R. Dicyclohexylcarbodiimide modification of bovine heart mitochondrial transhydrogenase // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 8963-8969.
1180. Pennington R. M., Fisher R. R. Reconstituted mitochondrial transhydrogenase is a transmembrane protein // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 164. P. 345-349.
1181. Percy J. M., Pryde J. G., Apps D. K. Isolation of ATPase I, the proton pump of chromaffin-granule membranes // *Biochem. J.* 1985. Vol. 231. P. 557-564.
1182. Perlin D. S., Latchney L. R., Senior A. E. Inhibition of *Escherichia coli* H^+ -ATPase by venturicidin, oligomycin and ossamycin // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 807. P. 238-244.
1183. Perlin D. S., San Francisco M. J. D., Slayman C. W., Rosen B. P. H^+ /ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1986. Vol. 248. P. 53-61.
1184. Perski H.-J., Moll J., Thauer R. K. Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* // *Arch. Microbiol.* 1981. Vol. 130. P. 319-326.
1185. Perski H.-J., Schönheit P., Thauer R. K. Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 143. P. 323-326.
1186. Peschek G. A., Nitschmann W. H., Muhl R. Energy transduction in the

- cytoplasmic membrane of intact cell of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. P. 255-256.
1187. *Petrouleas V., Diner B. A.* Identification of Q_{400} , a high-potential electron acceptor of photosystem II, with the iron of the quinone-iron acceptor complex // *Biochim. et. Biophys. acta.* 1986. Vol. 849. P. 264-275.
 1188. *Pfanner N., Neupert W.* Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier // *EMBO J.* 1985. Vol. 4. P. 2819-2825.
 1189. *Pfanner N., Neupert W.* Transport of F_1 -ATPase subunit β into mitochondria depends on both a membrane potential and nucleoside triphosphates // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 209. P. 152-156.
 1190. *Pfister C., Pongeois R.* Mesure electrique directe du fonctionnement de l'adenosine triphosphatase des particules submitochondriales des coeur de Boeuf // *C. r. Acad. sci. D.* 1978. Vol. 287. P. 341-343.
 1191. *Phelps D. C., Hatefy Y.* Inhibition of the mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase by dicyclohexylcarbodiimide and diethylpyrocarbonate // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 8217-8221.
 1192. *Phelps D. C., Hatefy Y.* Interaction of purified nicotinamidenucleotide transhydrogenase with dicyclohexylcarbodiimide // *Biochemistry* 1984. Vol. 23. P. 4475-4480.
 1193. *Phillips A. L., Gray J. C.* Isolation and characterization of a cytochrome $b-f$ complex from pea chloroplasts // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 137. P. 553-560.
 1194. *Pick U., Racker E.* Purification and reconstitution of the N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive ATPase complex from spinach chloroplasts // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 2793-2799.
 1195. *Pogge-von Strandmann R., Kay R. R., Dufour J.-P.* An electrogenic proton pump in plasma membranes from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 175. P. 422-427.
 1196. *Ponnamperuma S., Sagan C., Mariner R.* Synthesis of adenosine triphosphate under possible primitive earth conditions // *Nature.* 1963. Vol. 199. P. 222-226.
 1197. *Poole R. J.* Energy coupling for membrane transport // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1978. Vol. 29. P. 437-460.
 1198. *Poole R. J.* Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins // *Biochim. et biophys. acta.* 1983. Vol. 726. P. 205-243.
 1199. *Porter A. C. G., Kumamoto C., Aldape K., Simoni R. D.* Role of the b subunit of the *Escherichia coli* protontranslocating ATPase // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 8182-8187.
 1200. *Pougeois R., Satre M., Vignais P. V.* Reactivity of mitochondrial F_1 -ATPase to dicyclohexylcarbodiimide. Inactivation and binding studies // *Biochemistry.* 1979. Vol. 18. P. 1408-1413.
 1201. *Pouyssegur J.* The growth factor-activatable Na^+/H^+ exchange system: a genetic approach // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 453-455.
 1202. *Pouyssegur J., Franchi A., L'Allemain G., Paris S.* Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 190. P. 115-119.
 1203. *Pouyssegur J., Sardet C., Franchi C., L'Allemain G., Paris S.* A specific mutation abolishing Na^+/H^+ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 4833-4837.
 1204. *Power S. D., Lochrie M. A., Sevarino K. A., Patterson T. E., Poyton R. O.* The nuclear-coded subunits of yeast cytochrome c oxidase. I. Fractionation of the holoenzyme into chemically pure polypeptides and the identification of two new subunit using solvent extraction and reversed phase high performance liquid chromatography // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 6564-6570.

1205. *Powers L., Blumberg W. E., Chance B., Barlov C. H., Leigh J. S., Smith J., Yonetani T., Vik S., Peisach J.* The nature of the copper atoms of cytochrome c oxidase as studied by optical and X-ray absorption edge spectroscopy // *Biochim. et biophys. acta.*, 1979. Vol. 546. P. 520-538.
1206. *Pozzan T., Miconi V., di Virgilio F., Azzone G. F.* H^+ /site, charge/site and ATP/site ratios at coupling sites I and II in mitochondrial e^- transport // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 10200-10205.
1207. *Prange R. W., David C. L., Clark J. H.* Propionate production in the rumen of Holstein steers fed either control or monensin supplemented diet // *J. Anim. Sci.* 1978. Vol. 46. P. 1200-1204.
1208. *Prats M., Tocanne J.-F., Teissie J.* Lateral proton conduction at a lipid/water interface. Its modulation by physical parameters. Experimental and mathematical approaches // *Europ. J. Biochem.* 1985. Vol. 149. P. 663-668.
1209. *Pratt S. A.* An electron microscope study of nebenkern formation and differentiation in spermatids of *Murgantia histrionica* (Hemiptera, Pentatomidae) // *J. Morphol.* 1968. Vol. 126. P. 31-66.
1210. *Pressman B. C., Harris E. J., Jagger W. S., Johnson J. H.* Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1967. Vol. 58. P. 1949-1956.
1211. *Pressman B. C., Lardy H. A.* Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.* 1956. Vol. 21. P. 458-466.
1212. *Pringle M. J., Taber M.* Fluorescent analogues of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide as structural probes of the bovine mitochondrial proton channel // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 7366-7371.
1213. *Prochaska L. J., Bisson R., Capaldi R. A., Steffens C. M.* Inhibition of cytochrome c oxidase function by dicyclohexylcarbodiimide // *Biochim. et. biophys. acta.* 1981. Vol. 637. P. 360-373.
1214. *Prochaska L. J., Reynolds K. A.* Characterization of electron-transfer and proton-translocation activities in bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase deficient in subunit III // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 781-787.
1215. *Proverbio F., Condrescu-Guidi D., Whittembury G.* Ouabain-insensitive Na^+ stimulation of a Mg^{2+} -dependent ATPase in kidney tissue // *Biochim. et. biophys. acta.* 1975. Vol. 394. P. 281-292.
1216. *Proverbio F., del Castillo J. R.* Na^+ -stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes // *Ibid.* 1981. Vol. 646. P. 99-108.
1217. *Puettner I., Carafoli E., Malatesta F.* Spectroscopic and functional properties of subunit III-depleted cytochrome oxidase // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 3719-3723.
1218. *Pullman M. E., Penejsky H., Racker E.* A soluble protein function required for coupling phosphorylation to oxidation in submitochondrial fragments of beef heart mitochondria // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1958. Vol. 76. P. 227-232.
1219. *Qureshi Y., Wood T.* The effect of carnosine on glycolysis // *Biochim. et biophys. acta.* 1962. Vol. 60. P. 190-192.
1220. *Rabon E., Gunther R. D., Soumarmon A., Bassilian S., Lewin M., Sachs G.* Solubilization and reconstitution of the gastric H, K-ATPase // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 10200-10207.
1221. *Racker E.* Studies of factors involved in oxidative phosphorylation // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1962. Vol. 48. P. 1659-1663.
1222. *Racker E.* A mitochondrial factor conferring oligomycin sensitivity on soluble mitochondrial ATPase // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1963. Vol. 10. P. 345-347.
1223. *Racker E.* Mechanisms in bioenergetics. L.: Acad. press, 1965. 259 p.

1224. *Racker E.* Reconstitution of cytochrome oxidase vesicles and conferral of sensitivity to energy transfer inhibitors // *J. Membrane Biol.* 1972. Vol. 10. P. 221—235.
1225. *Racker E.* A new look at mechanisms in bioenergetics. N. Y.; San Francisco; L.: Acad. press, 1976. 197 p.
1226. *Racker E.* Reconstitutions: past, present and future // *Membrane bioenergetics* /Ed. C. P. Lee et. al. L.: Addison-Wesley, 1979. 609 p.
1227. *Racker E.* Concepts and experiments in bioenergetics // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* /Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 377—394.
1228. *Racker E., Kandrash A.* Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXIX. Reconstitution of the third segment of oxidative phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248. P. 5841—5847.
1229. *Racker E., Stoekenius W.* Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation // *Ibid.* 1974. Vol. 249. P. 662—663.
1230. *Radstock U., Bredt W.* Motility of *Mycoplasma pneumoniae* // *J. Bacteriol.* 1977. Vol. 129. P. 1495—1501.
1231. *Rafael J., Patzel J., Vsiansky P.* Thermoregulatory significance of brown adipose tissue in the rat and the djungarian hamster // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. B. P. 547—548.
1232. *Ragan C. I.* NAD-ubiquinone oxidoreductase // *Biochim. et biophys. acta.* 1976. Vol. 456. P. 249—290.
1233. *Ragan C. I.* NADH dehydrogenase // IV Europ. bioenerg. conf. Prague, 1986. P. 6—7.
1234. *Ragan C. I., Smith S., Earley F. G. P., Poore V. M.* NADH dehydrogenase // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* /Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 59—68.
1235. *Ragan I., Hinkle P. C.* Ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase and phospholipids // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250. P. 8472—8476.
1236. *Ragan I., Racker E.* Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXVIII. The reconstitution of the first site of energy conservation // *Ibid.* 1973. Vol. 248. P. 2563—2569.
1237. *Rambourg A., Segretain D.* Three-dimensional electron microscopy of mitochondria and endoplasmic reticulum in the red muscle fiber of the rat diaphragm // *Anat. Rec.* 1980. Vol. 197. P. 33—48.
1238. *Ramsay R. R., Salach J. I., Dagar J., Singer T. P.* Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism // *Biochem. a Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 135. P. 269—275.
1239. *Ramsay R. R., Salach J. I., Singer T. P.* Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺ // *Ibid.* Vol. 134. P. 743—748.
1240. *Ramsay R. R., Tubbs P. K.* The effects of temperature and some inhibitors on the carnitine exchange system of heart mitochondria // *Europ. J. Biochem.* 1976. Vol. 69. P. 299—303.
1241. *Randall S. K., Sze H.* Properties of the partially purified tonoplast H⁺-pumping ATPase from oat roots // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 261. P. 1364—1371.
1242. *Ravanel P., Tissut M., Douce R.* Platanetin: a potent natural uncoupler and inhibitor of the exogenous NADH dehydrogenase in intact plant mitochondria // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 80. P. 500—504.
1243. *Ravid S., Eisenbach M.* Direction of flagellar rotation in bacterial cell envelopes // *J. Bacteriol.* 1984. Vol. 158. P. 222—230.

1244. *Rea Pa, Poole R. J.* Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles // *Plant Physiol.* 1985. Vol. 77. P. 46—52.
1245. *Reeves J. P., Reames T.* ATP stimulates amino acid accumulation by lysosomes incubated with amino acid methyl esters // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 6047—6053.
1246. *Reeves R. E.* How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? // *Trends Biochem. Sci.* 1976. Vol. 1. P. 53—55.
1247. *Renard M., Delmelle M.* Effect of pH on the stoichiometry of light-induced proton release and uptake from purple membrane suspensions // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 809. P. 331—336.
1248. *Rhoads D. B., Epstein W.* Energy coupling to net K⁺ transport in *Escherichia coli* K-12 // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252. P. 1394—1401.
1249. *Rial E., Poustie A., Nicholls D. G.* Brown-adipose tissue mitochondria: the regulation of the 32000-M_r uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides // *Europ. J. Biochem.* 1983. Vol. 137. P. 197—203.
1250. *Rich P. R.* Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc₁ complexes // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. Vol. 768. P. 53—79.
1251. *Rich P. R., Heathcote P.* Light-activated protonmotive force generation in lipid vesicles containing cytochrome bc₁ complex and bacterial reaction centres // *Ibid.* 1983. Vol. 725. P. 332—340.
1252. *Rich P. R., Wikström M.* Evidence for a mobile semiquinone in the redox cycle of the mammalian cytochrome bc₁ complex // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 194. P. 176—182.
1253. *Ricquier D., Thibault J., Bouilland F., Kuster Y.* Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 6675—6677.
1254. *Ridgway H. F.* Source of energy for gliding motility in *Flexibacter polymorphus*: effects of metabolic and respiratory inhibitors on gliding movement // *J. Bacteriol.* 1977. Vol. 131. P. 544—556.
1255. *Riedel N., Bachmann M., Fasold H.* Transport of proteins, mRNAs and mRNPs by vesicles from rat liver nuclear membranes // XV FEBS Meet. Abstr. Brussel, 1983. P. 154.
1256. *Rieter H., Kesper A., Adam G.* Differential effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on proliferation and viability of normal and transformed fibroblasts in vitro // *Europ. J. Cell Biol.* 1985. Vol. 36. P. 54.
1257. *Riezman H., Hay R., Witte C., Nelson N., Schatz G.* Yeast mitochondrial outer membrane specifically binds cytoplasmically-synthesized precursors of mitochondrial proteins // *EMBO J.* 1983. Vol. 2. P. 1113—1118.
1258. *Robert B., Lutz M., Tiede D. M.* Selective photochemical reduction of either of the two bacteriopheophytins in reaction centers of Rps. sphaeroides R-26 // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 183. P. 326—330.
1259. *Robertson R. N.* Ion transport and respiration // *Biol. Rev.* 1960. Vol. 35. P. 231—264.
1260. *Robertson R. N.* Protons, electrons, phosphorylation and active transport. Cambridge Univ. press, 1968. 96 p.
1261. *Robinson S. P.* The involvement of stromal ATP in maintaining the pH gradient across the chloroplast envelope in the light // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 806. P. 187—194.
1262. *Rödel G., Müller G., Bandlow W.* Cyclic AMP receptor protein from yeast mitochondria: submitochondrial localization and preliminary characterization // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 7—12.
1263. *Roes-Jones R., Al-Avgati Q.* Proton-translocating adenosine triphosphatase in rough and smooth microsomes from rat liver // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 2236—2240.

1264. Rogers M. J., Strittmatter P. Evidence for random distribution and translational movement of cytochrome b_5 in endoplasmic reticulum // J. Biol. Chem. 1974a. Vol. 249. P. 895—900.
1265. Rogers M. J., Strittmatter P. The binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b_5 reductase to hepatic microsomes // Ibid. 1974b. Vol. 249. P. 5565—5569.
1266. Rohde M., Dakena P., Mayer F., Dimroth P. Morphological properties of proteoliposomes reconstituted with the Na^+ pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella alcalescens* // FEBS Lett. 1986. Vol. 195. P. 280—284.
1267. Roseman M., Holloway P. W., Calabro M. A., Thompson T. E. Exchange of cytochrome b_5 between phospholipid vesicles // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 252. P. 4842—4849.
1268. Rosen B. P. ATP-driven anion pumps: the mechanism of plasmid-mediated arsenical resistance in *Escherichia coli* // XIII Intern. Biochem. Congr. Abstr. Amsterdam, 1985. Vol. TH.P. 569.
1269. Rosen B. P. Recent advances in bacterial ion transport // Annu. Rev. Microbiol. 1986. Vol. 40. P. 263—286.
1270. Rossi F. The O_2^- -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function // Biochem. et biophys. acta, 1986. Vol. 853. P. 65—89.
1271. Rothschild K. J., Roepe P., Ahl P. L., Earnest T. N., Bogomolni R. A., Das Gupta S. K., Mulliken C. M., Herzfeld J. Evidence for a tyrosine protonation change during the primary phototransition of bacteriorhodopsin at low temperature // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986. Vol. 83. P. 347—351.
1272. Rothwell N. J., Stock M. J. Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats exhibiting diet-induced thermogenesis // Pflügers Arch. 1981. Vol. 389. P. 237—242.
1273. Rothwell N. J., Stock M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis // Nature. 1986. Vol. 281. P. 34—35.
1274. Rottenberg H. The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles and vesicles // Meth. Enzymol. 1979. Vol. 55. P. 547—569.
1275. Rottenberg H. General anesthetics: a new class of uncouplers in mitochondria // Biophys. J. 1983. Vol. 41. P. 139a.
1276. Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations // J. Membrane Biol. 1984. Vol. 81. P. 127—138.
1277. Rottenberg H., Gutman M. Control of the rate of reverse electron transport in submitochondrial particles by the free energy // Biochemistry. 1977. Vol. 16. P. 3220—3226.
1278. Rottenberg H., Hashimoto K. Fatty acid uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria // Ibid. 1986. Vol. 25. P. 1747—1755.
1279. Rubin L. J., Nolte J. F. Modulation of the response of a photosensitive muscle by β -adrenergic regulation of cyclic AMP levels // Nature. 1984. Vol. 307. P. 551—553.
1280. Ruby E. G., McCabe J. B. An ATP transport system in the intracellular bacterium, *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J // J. Bacteriol. 1986. Vol. 167. P. 1066—1070.
1281. Rudzinska M. A., D'Alessandro P. A., Trager W. The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the *Leishmania*-septomonad transformation // J. Protozool. 1964. Vol. 11. P. 166—191.
1282. Runswick M. J., Walker J. E. The amino acid sequence of the β -subunits of ATP synthase from bovine heart mitochondria // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 3081—3089.

- 1282a. Russel J. T. ΔpH , H^+ diffusion potentials and Mg^{2+} -ATPase in neurosecretory vesicles isolated from bovine neurohypophyses // Ibid. 1984. Vol. 259. P. 9496—9507.
- 1282b. Russel J. T., Holz R. W. Measurement of ΔpH and membrane potential in isolated neurosecretory vesicles from bovine neurohypophyses // Ibid. 1981. Vol. 256. P. 5950—5953.
1283. Rydstrom J., Lee C.-P., Ernster L. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenase // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle L.: Addison-Wesley, 1981. P. 483—508.
1284. Rydstrom J., Persson B., Tang H.-I. Mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase // Bioenergetics / Ed. L. Ernster. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 207—219.
1285. Sabelnikov A. G., Domaradsky I. V. Effect of metabolic inhibitors on entry exogenous deoxyribonucleic acid into Ca^{2+} -treated *Escherichia coli* cells // J. Bacteriol. 1981. Vol. 146. P. 435—443.
1286. Sachs G., Koelz H. R., Berglinde T., Rabon E., Saccomani G. Aspects of gastric proton-transport ATPase // Membranes and transport / Ed. A. N. Martonosi. L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 633—643.
1287. Sackmann E., Träuble H. Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. I. Use of spin labels and optical probes as indicators of the phase transition // J. Amer. Chem. Soc. 1972a. Vol. 94. P. 4482—4491.
1288. Sackmann E., Träuble H. Studies of crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. II. Analysis of electron spin resonance spectra of steroid labels incorporated into lipid membranes // Ibid. 1972b. Vol. 94. P. 4492—4498.
1289. Saermark T., Flint N., Evans W. H. Hepatic endosome fractions containing an ATP-driven proton pump // Biochem. J. 1985. Vol. 225. P. 51—58.
1290. Saier M. H. The bacterial phosphotransferase system in regulation of carbohydrate permease synthesis and activity // Membranes and transport / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 2. P. 27—32.
1291. Sakamoto J. Effect of dimethylsulfoxide on ATP synthesis by mitochondrial soluble F_1 -ATPase // J. Biochem. 1984. Vol. 96. P. 483—487.
1292. Sakamoto J., Tonomura Y. Synthesis of enzyme-bound ATP by mitochondrial soluble F_1 -ATPase in the presence of dimethylsulfoxide // Ibid. 1983. Vol. 93. P. 1601—1614.
1293. Salama F. R. Structure and function of cytochromes // Annu. Rev. Biochem. 1977. Vol. 46. P. 299—330.
1294. Salioz M. Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes // Trends Biochem. Sci. 1984. Vol. 9. P. 309—312.
1295. Sallman A. L., Lubansky H. J., Tabor Z., Arruda J. A. L. Plasma membrane proton ATPase from human kidney // Europ. J. Biochem. 1986. Vol. 157. P. 547—551.
1296. Saltzgeber-Müller J., Kunapuli S. P., Douglas M. G. Nuclear genes coding the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. Isolation of ATP2 coding the F_1 -ATPase subunit // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 11465—11470.
1297. Salviati G., Salvatori S., Betto R., Margreth A. Molecular and antigenic properties of cytochrome b_5 from slow-muscle sarcoplasmic reticulum // Biochem. J. 1981. Vol. 197. P. 515—518.
1298. Sandmann G., Malkin R. Light inhibition of respiration is due to a dual function of the cytochrome b_5 - f complex and the plastocyanin / cytochrome c_{553} pool in *Aphanocapsa* // Arch. Biochem. a. Biophys. 1984. Vol. 234. P. 105—111.
1299. Santore U. J., Greenwood A. D. The mitochondrial complex in *Cryptophyceae* // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 112. P. 207—218.

1300. *Saphon S., Jackson J. B., Lerbs V., Witt H. T.* The functional unit of electrical events and phosphorylation in chromatophores from *Rhodospseudomonas sphaeroides* // *Biochem. et. Biophys. acta.* 1975. Vol. 408. P. 58—66.
1301. *Saraste M.* Location of haem-binding sites in the mitochondrial cytochrome *b* // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 166. P. 367—372.
1302. *Saraste M., Deatherage M. A., Naughton M. A., Runswick M. J., Walker J. E.* ATP—synthase and F_1 —ATPase from bovine mitochondria // *II Europ. bioenerg. conf.* Lyon, 1982. P. 629.
1303. *Saraste M., Penttilä T., Wikström M.* Quaternary structure of bovine cytochrome oxidase // *Europ. J. Biochem.* 1981. Vol. 115. P. 261—268.
1304. *Saraste M., Raitio M., Jalli T., Peramaa A.* A gene in *Paracoccus* for subunit III of cytochrome oxidase // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 206. P. 154—156.
1305. *Sarti P., Jones M. G., Antonini G., Malatesta F., Colosimo A., Wilson M. T., Brunori M.* Kinetics of redoxlinked proton pumping activity of native and subunit III-depleted cytochrome *c* oxidase: A stopped-flow investigation // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1985. Vol. 82. P. 4876—4880.
1306. *Sato K.* Protein-pigments and photosystem II reaction center // *Photochem. a. Photobiol.* 1985. Vol. 42. P. 845—853.
1307. *Sautereau A.-M., Trombe M.-C.* Electric transmembrane potential mutation and resistance to the cationic and amphiphilic antitumoral drugs derived from pyridocarbazole, 2,N-methylellipticinium and 2,N-methyl-9-hydroxyellipticinium, in *Streptococcus pneumoniae* // *J. Gen. Microbiol.* 1986. Vol. 132. P. 2637—2641.
1308. *Saygin O., Witt H. T.* Sequence of the redox changes of manganese and pattern of the changes of charges during water cleavage in photosynthesis. Optical events in the UV and the red region in presence and absence of hydroxylamine // *Photobiophys. a. Photobiophys.* 1985. Vol. 10. P. 71—82.
1309. *Saz H. J.* Energy metabolisms of parasitic helminths: adaptation to parasitism // *Annu. Rev. Physiol.* 1981. Vol. 43. P. 323—341.
1310. *Scarborough G. A.* The *Neurospora* plasma membrane ATPase is an electrogenic pump // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1976. Vol. 73. P. 1485—1486.
1311. *Schagger H., Borscheert H., Aquila H., Link T. A., Jagow G. von.* Isolation and amino acid sequence of the smallest subunit of beef heart *bc₁* complex // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 190. P. 89—94.
1312. *Schatz G.* How proteins are targeted to their correct locations within mitochondria // *XVII FEBS Meet. Abstr.* West Berlin, 1986. P. 9.
1313. *Schatz G., Racker E.* Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VII. Oxidative phosphorylation in the diphosphopyridine nucleotide-cytochrome *b* segment of the respiratory chain: assay and properties of submitochondrial particles // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241. P. 1429—1437.
1314. *Scherman D., Nordmann J., Henry J.-P.* Existence of an adenosine 5'-triphosphate dependent proton translocase in bovine neurosecretory granule membrane // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 687—694.
1315. *Schimada T., Horita K., Murakami M., Ogura R.* Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells // *Cell a. Tissue Res.* 1984. Vol. 238. P. 577—582.
1316. *Schindler H., Nelson N.* Proteolipid of adenosinetriphosphatase from yeast mitochondria forms protonselective channels in planar lipid bilayers // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 5787—5794.
1317. *Schink B., Pfennig N.* *Propionigenium modestum* gen. nov. sp. nov.: a new, strictly anaerobic, nonsporing bacterium growing on succinate // *Arch. Microbiol.* 1982. Vol. 133. P. 209—216.

1318. *Schlesinger M., Magee A. J.* Fatty acid acylation of membrane proteins // *Biophys. J.* 1982. Vol. 37. P. 126—127.
1319. *Schleyer M., Neupert W.* Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes // *Cell.* 1985. Vol. 43. P. 339—350.
1320. *Schleyer M., Schmidt B., Neupert W.* Requirement of a membrane potential for the post-translational transfer of proteins into mitochondria // *Europ. J. Biochem.* 1982. Vol. 125. P. 109—116.
1321. *Schliepake W., Junge W., Witt H. T.* Correlation between field formation, proton translocation, and the light reactions in photosynthesis // *Ztschr. Naturforsch. B.* 1968. Vol. 23. P. 1571—1574.
1322. *Schlödter E., Witt H. T.* Relation between the initial kinetics of ATP synthesis and of conformational changes in the chloroplast ATPase studied by external field pulses // *Biochim. et Biophys. acta.* 1981. Vol. 635. P. 571—584.
1323. *Schmidt B., Hennig B., Kohler H., Neupert W.* Transport of the precursor to *Neurospora* ATPase subunit 9 into yeast mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 4687—4689.
1324. *Schmidt G., Gräber P.* The rate of ATP synthesis by reconstituted CF_0F_1 liposomes // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. Vol. 808. P. 45—51.
1325. *Schmidt W., Winkler H., Plattner H.* Proteasesensitive 10 nm particles on the surface of chromaffin granules: the presumable equivalent of the protontranslocating ATPase // *VIII Meet. Intern. Soc. Neurochem.* Nottingham, 1981. P. 352.
1326. *Schneider D. L.* ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 3858—3864.
1327. *Schneider W. R., Doetsch R. N.* Effect of viscosity on bacterial motility // *J. Bacteriol.* 1974. Vol. 117. P. 696—701.
1328. *Schöbert B., Lanyi J. K.* Halorhodopsin is a light-driven chloride pump // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 10306—10313.
1329. *Schoenknecht G., Junge W., Lill H., Engelbrecht S.* Complete tracking of proton flow in thylakoids — the unit conductance of CF_0 is greater than 10 fS // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 203. P. 289—293.
1330. *Scholes P., Mitchell P., Moyle J.* The polarity of proton translocation in some photosynthetic microorganisms // *Europ. J. Biochem.* 1969. Vol. 8. P. 450—454.
1331. *Scholes T., Hinkle P. C.* Energetics of ATP-driven reverse electron transfer from cytochrome *c* to fumarate and from succinate to NAD in submitochondrial particles // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 3344—3345.
1332. *Schönheit P., Beimborn D. B.* Presence of a Na^+/H^+ antiporter in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its role in Na^+ dependent methanogenesis // *Arch. Microbiol.* 1985a. Vol. 142. P. 354—361.
1333. *Schönheit P., Beimborn D. B.* ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* coupled to CH_4 formation from H_2 and CO_2 in the apparent absence of an electrochemical proton potential across the cytoplasmic membrane // *Europ. J. Biochem.* 1985b. Vol. 148. P. 545—550.
1334. *Schönheit P., Beimborn D. B., Perski H.-J.* Potassium accumulation in growing *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its relation to the electrochemical proton gradient // *Arch. Microbiol.* 1984. Vol. 140. P. 247—251.
1335. *Schönheit P., Perski H.-J.* ATP synthesis driven by a potassium diffusion potential in *Methanobacterium thermoautotrophicum* is stimulated by sodium // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. Vol. 20. P. 263—267.
1336. *Schotz F.* Dreidimensionale, maßstabgetreue Rekonstruktion einer grünen Flagellatenzelle nach Elektronenmikroskopie von Serienschritten // *Planta.* 1972. Vol. 102. P. 152—159.
1337. *Schultheiss H.-P., Schwimbeck P. L., Berg P. A.* The biochemical characterization of auto-antibodies against the adenine-nucleotide-translo-

- cator in primary biliary cirrhosis (PBC) // II Europ. bioenerg. conf. Lyon, 1984. P. 451.
1338. *Schwanke N., Bouffant F., Doree M., Peuch C. J.* Protein kinase C: properties and possible role in cellular division and differentiation // *Biochimie*. 1985. Vol. 67. P. 1103—1110.
 1339. *Schwartz A., Collins J. H.* Na^+/K^+ -ATPase. Structure of the enzyme and mechanism of action of digitalis // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 521—527.
 1340. *Schwerzmann K., Pedersen P. L.* Regulation of the mitochondrial ATP synthase // *ATPase complex* // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1986. Vol. 250. P. 1—18.
 1341. *Seckler R., Moroy T., Wright J. K., Overath P.* Anti-peptide antibodies and proteases as structural probes for the lactose / H^+ transporter of *Escherichia coli*: a loop around amino acid residue 130 faces the cytoplasmic side of the membrane // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 2403—2409.
 1342. *Seckler R., Wright J. K.* Sidedness of native membrane vesicles of *Escherichia coli* and orientation of the reconstituted lactose: H^+ carrier // *Europ. J. Biochem.* 1984. Vol. 142. P. 269—279.
 1343. *Sedgwick E. G., Bragg P. D.* Uncoupler-induced relocation of elongation factor T_{u} to the outer membrane in an uncoupler-resistant mutant of *Escherichia coli* // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. Vol. 856. P. 50—58.
 1344. *Sedgwick E. G., Hou C., Bragg P. D.* Effect of uncouplers on the bioenergetic properties of a carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone-resistant mutant *Escherichia coli* UV6 // *Ibid.* 1984. Vol. 767. P. 479—492.
 1345. *Seidman L., Entner N.* Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides* // *J. Biol. Chem.* 1961. Vol. 236. P. 915—919.
 1346. *Seiff F., Wallat I., Ermann P., Heyn M. P.* A neutron diffraction study on the location of the polyene chain of retinal in bacteriorhodopsin // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*. 1985. Vol. 82. P. 3227—3231.
 1347. *Seigneuret M., Rigaud J.-L.* Use of the fluorescent pH probe pyramine to detect heterogenous directions of proton movement in bacteriorhodopsin reconstituted large liposomes // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 188. P. 101—106.
 1348. *Semenza G.* The electrogenic Na^+ , *D*-glucose cotransporter; isolation and first insights in its mode of functioning // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984. P. 66.
 1349. *Sengers R. C. A., Stadhouders A. M., Trijbels J. M. F.* Mitochondrial myopathies, clinical, morphological and biochemical aspects // *Europ. J. Pediatr.* 1984. Vol. 141. P. 192—207.
 1350. *Senior A. E.* Secondary and tertiary structure of membrane proteins involved in proton translocation // *Biochim. et biophys. acta*. 1983. Vol. 726. P. 81—95.
 1351. *Seren S., Casadio R., Sorgato M. C.* Fusion of bacteriorhodopsin with submitochondrial particles yields a new system with retention of energy coupling and acquisition of photophosphorylation activity // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. Vol. 840. P. 370—376.
 1352. *Serrano R.* Purification and reconstitution of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membranes // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1983. Vol. 227. P. 1—8.
 1353. *Setif P., Mathis P., Vanngard T.* Heterogeneity in pathways for electron transfer to the secondary acceptors and for recombination process // *Biochim. et biophys. acta*. 1984. Vol. 767. P. 404—414.
 1354. *Seto-Young D., Garcia M. L., Krulwich T. A.* Reconstitution of a bacterial Na^+/H^+ antiporter // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 11393—11395.
 1355. *Setty O. H., Hendler R. W., Shrager R. I.* Simultaneous measurements of proton motive force, ΔpH , membrane potential, and H^+/O ratios in intact *Escherichia coli* // *Biophys. J.* 1983. Vol. 43. P. 371—381.

1356. *Severin S. E.* Problems concerned with the biological activity of naturally occurring imidazole compound // VI Intern. Congr. Biochem. N. Y., 1964. P. 1—17.
1357. *Severina I. I.* Nystatin-induced increase in photocurrent in the system «bacteriorhodopsin proteliposome/bilayer planar membrane» // *Biochim. et biophys. acta*. 1982. Vol. 681. P. 311—317.
1358. *Severina I. I.* In vivo membrane potential studies in cyanobacteria by fluorescent cation ethylrhodamine // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow, 1984. P. 296.
1359. *Severina I. I., Skulachev V. P.* Ethylrhodamine as a fluorescent penetrating cation and a membrane potential-sensitive probe in cyanobacterial cells // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 165. P. 67—71.
1360. *Seyfred M. A., Kohnken R. E., Collins C. A., McConnell D. G.* Rapid diglyceride phosphorylation in isolated bovine rod outer segments // *Biochem. a. Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol. 123. P. 121—127.
1361. *Seymour R. S., Barnhart M. C., Bartholomew G. A.* Respiratory gas exchange during thermogenesis in *Philodendron selloum* // *Koch. Planta*. 1984. Vol. 161. P. 229—232.
1362. *Shakhov Yu. A., Mansurova S. E., Kulaev I. S.* Lipid-dependent mitochondrial pyrophosphatase // *Biochem. Intern.* 1981. Vol. 3. P. 139—145.
1363. *Shakhov Yu. A., Nyren P., Baltscheffsky M.* Reconstitution of highly purified proton-translocating pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 146. P. 177—180.
1364. *Shapron Y. P.* Observation d'un photopotential transitoire de la rhodopsin en preparation visculaire de membranes de batonnets retinies // *C. R. Acad. sci. D*. 1979. Vol. 288. P. 155—158.
1365. *Shapron Y. P.* Rhodopsin-induced transient photopotentials in retinal and vesicle membranes // *Photobiochem. a. Photobiophys.* 1980. Vol. 1. P. 297—304.
1366. *Sharkov A. V., Pakulev A. V., Chekalin S. V., Matveetz Yu. A.* Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy // *Biochim. et biophys. acta*. 1985. Vol. 808. P. 94—102.
1367. *Sherman M. Yu.* Interrelation between taxis and sporulation systems // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 149. P. 192—197.
1368. *Shieh P. K., Lanyi J., Packer L.* Lipid-impregnated filter membranes: a stable planar membrane system for assay of electrical properties across reconstituted liposomes and natural membrane vesicles // *Meth. Enzymol.* 1979. Vol. 55. P. 604—613.
1369. *Shimmen T., Tasawa M.* Control of membrane potential and excitability of Chara cells with ATP and Mg^{2+} // *J. Membrane. Biol.* 1977. Vol. 33. P. 167—192.
1370. *Shioi J., Taylor B. L.* Oxygen taxis and proton motive force in *Salmonella typhimurium* // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259. P. 10983—10988.
1371. *Shneiderman R., Avi-Dor Y.* The uptake and extrusion of salts by the halotolerant bacterium, *Ba₁* // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1982. Vol. 213. P. 117—185.
1372. *Sholes P. B., Smith L.* Composition and properties of the membrane-bound respiratory chain system of *Micrococcus denitrificans* // *Biochim. et biophys. acta*. 1968. Vol. 153. P. 375—383.
1373. *Shomyn A., Mariottini P., Cleeter M. W. J., Ragan C. I., Matsuno-Yagi A., Hatefy Y., Doolittle R. F., Attardi G.* Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode component of the respiratory-chain NADH dehydrogenase // *Nature*. 1985. Vol. 314. P. 592—597.
1374. *Shu-I Tu, Sliwinski B. J.* Mechanistic investigation on the temperature dependence and inhibition of corn root plasma membrane ATPase // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1985. Vol. 241. P. 348—355.
1375. *Shuvalov V. A., Ames J., Duysens L. N. M.* Picosecond charge separation upon selective excitation of the primary electron donor in reaction

- centers of Rhodospseudomonas viridis // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 851. P. 327—330.
1376. Shuvalov V. A., Asadov A. A. Arrangement and interaction of pigment molecules in reaction centers of Rhodospseudomonas viridis. Photodichroism and circular dichroism of reaction centers at 100° K // Ibid. 1979. Vol. 545. P. 296—308.
1377. Shuvalov V. A., Dolan E., Ke B. Spectral and kinetic evidence for two early electron acceptors in photosystem I // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1979. Vol. 76. P. 770—773.
1378. Shuvalov V. A., Duysens L. N. M. Primary electron transfer reactions in modified reaction centers from Rhodospseudomonas sphaeroides // Ibid. 1986. Vol. 83. P. 1690—1694.
1379. Shuvalov V. A., Krasnovsky A. A. Photochemical electron transfer in reaction centers of photosynthesis // Sovjet scientific review. Sec. D / Ed. V. P. Skulachev. Amsterdam: OPA. 1982. Vol. 3. P. 1—24.
1380. Shuvalov V. A., Nuijs T., Van Gorkom H. J., Smit H. W. J., Duysens L. N. M. Picosecond absorbance changes upon selective excitation of the primary electron donor P-700 in photosystem I // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 850. P. 319—323.
1381. Shuvalov V. A., Vasmel H., Amesz J., Duysens L. N. M. Picosecond spectroscopy of the charge separation in reaction centers of Chloroflexus aurantiacus with selective excitation of the primary electron donor // Ibid. Vol. 851. P. 361—368.
1382. Sidhu A., Beattie D. S. Kinetics of assembly of complex III into the yeast mitochondrial membrane. Evidence for a precursor to the iron-sulfur protein // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 10649—10656.
1383. Siebert I., Mantele W. Investigation of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin by low-temperature Fourier-transform infrared spectroscopy // Europ. J. Biochem. 1983. Vol. 130. P. 565—573.
1384. Siemens A., Walter R., Liaw L.-H., Berns M. W. Laser-stimulated fluorescence of submicrometer regions within single mitochondria of rhodamine-treated myocardial cells in culture // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 466—470.
1385. Siemens H. Mitochondrial Myopathien und Enzephalomyopathien. Neuromuskuläre und zentralnervöse Erkrankungen infolge von Defekten des mitochondrialen oxydativen Stoffwechsels // Monatsschr. Kinderheilk. 1985. Bd. 133. S. 798—805.
1386. Sigrist-Nelson K., Azzi A. The proteolipid subunit of the chloroplast adenosine triphosphatase complex. Reconstitution and demonstration of proton-conductive properties // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 10638—10643.
1387. Silhavy I. J., Benson S. A., Emr S. D. Mechanisms of protein localization // Microbiol. Rev. 1983. Vol. 47. P. 313—344.
1388. Silver S. Transport of cations and anions // Bacterial transport / Ed. B. P. Rosen (Microbiol. Ser.: Vol. 4): N. Y., Basel: Dekker, 1978. P. 221—324.
1389. Simpson L. The kinetoplast of the hemoflagellates // Intern. Rev. Cytol. 1972. Vol. 32. P. 139—207.
1390. Simpson S. J., Bendall M. R., Egan A. F., Vink R., Rogers M. J. High-field phosphorus NMR studies of the stoichiometry of the lactate / proton carrier in Streptococcus faecalis // Europ. J. Biochem. 1983. Vol. 136. P. 63—69.
1391. Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // Biochim. et biophys. acta. 1957. Vol. 23. P. 394—401.
1392. Skou J. C. Further investigations on a $Mg^{2+} + Na^{+}$ -activated adenosinetriphosphatase possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane // Ibid. 1960. Vol. 42. P. 6—23.

1393. Skulachev V. P. Regulation of the coupling of oxidation and phosphorylation // Proc. V Intern. Biochem. Congr. Moscow. 1963. Vol. 5. P. 365—374.
1394. Skulachev V. P. Electric fields in coupling membranes // FEBS Lett. 1970. Vol. 11. P. 301—319.
1395. Skulachev V. P. Energy transformation in the respiratory chain // Curr. Top. Bioenerg. 1971. Vol. 4. P. 127—190.
1396. Skulachev V. P. The driving forces and mechanisms of ion transport through coupling membranes // FEBS Symp. 1972. Vol. 28. P. 371—385.
1397. Skulachev V. P. Redox and hydrolytic generators of electric potential ($\Delta\psi$) in coupling membranes // IX FEBS Meet. Abstr. Budapest, 1973. P. 208.
1398. Skulachev V. P. Electric generators in coupling membranes: direct measurements of the electrogenic activity, molecular mechanism and some specific functions // X FEBS Meet. Abstr. Paris, 1975a. P. 225—238.
1399. Skulachev V. P. Energy coupling in biological membranes: Current state and perspectives // Energy transducing mechanisms / Ed. E. Racker. L.: Butterworth: MTP, 1975b. P. 31—73.
1400. Skulachev V. P. Three stages of the bacteriorhodopsin-mediated electrogenesis: a single turnover study // Proc. XI FEBS Meet. Copenhagen, 1977a. Vol. 45. P. 45—59.
1401. Skulachev V. P. Transmembrane electrochemical H^{+} -potential as a convertible energy source for the living cell // FEBS Lett. 1977b. Vol. 74. P. 1—9.
1402. Skulachev V. P. Membrane-linked energy buffering as the biological function of Na^{+}/K^{+} gradient // Ibid. 1978. Vol. 87. P. 171—179.
1403. Skulachev V. P. Na^{+}/K^{+} gradient as an energy reservoir in bacteria // Cation flux across biomembranes / Eds. J. Mukohata, L. Packer. N. Y.; San Francisco: L.: Acad. press, 1979a. P. 303—319.
1404. Skulachev V. P. Methods for reconstitution of the electrogenic function of membrane proteins // Meth. Enzymol. 1979b. Vol. 55. P. 751—776.
1405. Skulachev V. P. Transduction of light to electric energy in bacterial photosynthesis: a study by means of orthodox electrometer techniques // Photosynthesis in relation to model systems / Ed. J. Barber. Amsterdam; N. Y.; Oxford: Elsevier, 1979c. P. 175—188.
1406. Skulachev V. P. Integrating functions of biomembranes. Problems of lateral transport of energy, metabolites and electrons // Biochim. et biophys. acta. 1980a. Vol. 604. P. 297—320.
1407. Skulachev V. P. Membrane electricity as a convertible energy currency for the cell // Canad. J. Biochem. 1980b. Vol. 58. P. 161—175.
1408. Skulachev V. P. Pathways of generation and utilization of electrochemical potential of H^{+} ions in biomembranes // Sovjet scientific review. Sec. D / Ed. V. P. Skulachev. Amsterdam: OPA, 1980c. Vol. 1. P. 83—156.
1409. Skulachev V. P. Membrane electricity as a convertible energy currency for the cell // XI Intern. Biochem. Congr. Toronto, 1980d. P. 1—3.
1410. Skulachev V. P. The proton cycle: history and problems of the membrane-linked energy transduction, transmission and buffering // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 3—49.
1411. Skulachev V. P. Light-induced charge separation and formation of long-lived photoproducts as two distinct functions of animal rhodopsin // II Europ. bioenerg. conf. Lyon, 1982a. P. 347—348.
1412. Skulachev V. P. The dual role of rhodopsin in vision: light-driven charge translocation and formation of long-lived photoproducts // FEBS Lett. 1982b. Vol. 146. P. 244—254.
1413. Skulachev V. P. The localized $\Delta\mu H^{+}$ problem. The possible role of the local electric field in ATP synthesis // Ibid. 1982c. Vol. 146. P. 1—4.

1414. Skulachev V. P. Proteoliposomes: a model for studying $\Delta\bar{p}H$ -generating system // Liposome letters / Ed. A. D. Bangham. L., N. Y.: Acad. press, 1983. P. 197—214.
1415. Skulachev V. P. Membrane bioenergetics. Should we build the bridge across the river or alongside of it? // Trends Biochem. Sci. 1984a. V. 9. P. 182—185.
1416. Skulachev V. P. Sodium bioenergetics // Ibid. 1984b. Vol. 9. P. 483—485.
1417. Skulachev V. P. Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic function of sodium: H^+ is not unique as a coupling ion // Europ. J. Biochem. 1985. Vol. 155. P. 199—208.
1418. Skulachev V. P., Dibrov P. A., Glagolev A. N. Sodium cycle: an energy coupling system replacing the proton cycle in marine bacteria at alkaline pH // XV FEBS Meet. Abstr. Brussel, 1983, P. 68.
1419. Skulachev V. P., Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Zorina V. V., Danshina S. V. Proton transport and electrogenic phases in the bacteriorhodopsin photocycle // Proc. Symp. Light-sensitive Proteins. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 531—552.
1420. Skulachev V. P., Glagolev A. N., Dibrov P. A. Sodium cycle: a mechanism of energy coupling that replaces the proton cycle in marine bacteria under alkaline conditions // FEMS Symp. Abstr. Pushchino, 1983. P. 205—206.
1421. Skulachev V. P., Kozlov I. A. H^+ -ATPase and membrane energy coupling // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 463. P. 29—89.
1422. Skulachev V. P., Kozlov I. A. An H^+ -ATP synthetase: a substrate translocation concept // Curr. Top. Membr. a. Transp. 1982. Vol. 16. P. 285—301.
1423. Skulachev V. P., Sharaff A. A., Jaguzhinsky L. S., Jasaitis A. A., Liberman E. A., Topali V. P. The effect of uncouplers on mitochondria, respiratory enzyme complexes and artificial phospholipid membranes // Curr. Mod. Biol. 1968. Vol. 2. P. 98—105.
1424. Skulachev V. P., Sharaff A. A., Liberman E. A. Proton conductors in the respiratory chain and artificial phospholipid membranes // Nature. 1967. Vol. 216. P. 718—719.
1425. Slater E. C. Phosphorylation coupled with the oxidation of α -ketoglutarate by heart-muscle sarcosomes // Biochem. J. 1955. Vol. 59. P. 392—402.
1426. Slater E. C. The mechanism of action of the respiratory inhibitor antimycin // Biochim. et biophys. acta. 1973. Vol. 301. P. 129—154.
1427. Slayman C. L., Long W. S., Lu C. J.-H. The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa* // J. Membrane Biol. 1973. Vol. 14. P. 305—338.
1428. Slonczewski L. L., Rosen B. P., Alger J. R., Macnab R. M. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by $[^{31}P]$ nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1981. Vol. 78. P. 6274—6275.
1429. Smith D. A., Black C. C. Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues // Plant Physiol. 1984. Vol. 75. P. 862—864.
1430. Smith D. S., Jarlfors U., Cayer M. L. Structural cross-bridges between microtubules and mitochondria in central axons of an insect (*Periplaneta americana*) // J. Cell Sci. 1977. Vol. 27. P. 255—272.
1431. Smith E. L., Hill R. L., Lehman I. R., Lefkowitz R. J., Handler P., White A. Principles of biochemistry: general aspects. N. Y.: McGraw-Hill, 1983. 339 p.
1432. Smith R. E., Hoijer D. J. Metabolism and cellular function in cold acclimation // Physiol. Rev. 1962. Vol. 42. P. 60—142.
1433. Smith R. E., Horwitz B. A. Brown fat and thermogenesis // Ibid. 1969. Vol. 49. P. 330—425.
1434. Smith R. A., Ord M. J. Mitochondrial form and function relationships

- in vivo: their potential in toxicology and pathology // Intern. Rev. Cytol. 1980. Vol. 83. P. 63—134.
1435. Smith S. O., Lugtenburg J., Mathies R. A. Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy // J. Membrane Biol. 1985. Vol. 85. P. 95—109.
1436. Solioz M., Carafoli E., Ludwig B. The cytochrome *c* oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 1579—1582.
1437. Sone N., Hamamoto T., Kagawa Y. pH dependence of H^+ conduction through the membrane moiety of the H^+ -ATPase ($F_0 - F_1$) and effects of tyrosyl residue modification // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256. P. 2873—2877.
1438. Sone N., Hinkle P. Proton transport by cytochrome *c* oxidase from the thermophilic bacterium PS3 reconstituted in liposomes // Ibid. 1982. Vol. 257. P. 12600—12604.
1439. Sone N., Kosako T. Evidence for dimer structure of proton-pumping cytochrome *c* oxidase, an analysis by radiation inactivation // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 1515—1519.
1440. Sone N., Yanagita Y. High vectorial proton stoichiometry by cytochrome *c* oxidase from the thermophilic bacterium PS3 reconstituted in liposomes // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259. P. 1405—1408.
1441. Spitsberg V. L., Pfeiffer N. E., Partridge B., Wylie D. E., Schuster S. M. Isolation and antigenic characterization of corn mitochondrial F_1 -ATPase // Plant Physiol. 1986. Vol. 77. P. 339—345.
1442. Sprott G. D., Jarrell K. F. K^+ , Na^+ and Mg^{2+} content and permeability of *Methanospirillum hungatei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum* // Canad. J. Microbiol. 1981. Vol. 27. P. 444—451.
1443. Spudich J. L., Bogomolni B. A. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin // Nature. 1984. Vol. 312. P. 509—513.
1444. Spudich E. N., Spudich J. L. Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium* // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 4308—4312.
1445. Stadler H., Tsukita S. Synaptic vesicles contain an ATP-dependent proton pump and show «knob-like» protrusions on their surface // EMBO J. 1984. Vol. 3. P. 3333—3337.
1446. Staehelin L. A., Arntsen C. J. Regulation of chloroplast membrane function: protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components // J. Cell. Biol. 1983. Vol. 97. P. 1327—1337.
1447. Steffens G. C. M., Buse G., Opplige W., Ludwig B. Subunits I and II of bacterial and mitochondrial cytochrome oxidases are homologous // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 195—196.
1448. Steffens G. C. M., Steffens G. J., Buse G. Studies on cytochrome *c* oxidase. VIII. The amino acid sequence of polypeptide VII // Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 1979. Vol. 360. P. 1641—1650.
1449. Steffens G. J., Buse G. Studies on cytochrome *c* oxidase. IV. Primary structure and function of subunit II // Ibid. P. 613—619.
1450. Stein R. R., Castellvi A. L., Bogacz J. P., Wright C. A. Herbicide-quinone competition in the acceptor complex of photosynthetic reaction centers from *Rhodospseudomonas sphaeroides*: a bacterial model for PS-II-herbicide activity in plants // J. Cell. Biochem. 1984. Vol. 24. P. 243—259.
1451. Steinert M. Mitochondria associated with the kinetoculus of *Trypanosoma mega* // J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 1960. Vol. 8. P. 542—546.
1452. Stewart L. M. D., Bakker E. P., Booth I. R. Energy coupling to K^+ uptake via the Trk system in *Escherichia coli*: the role of ATP // J. Gen. Microbiol. 1985. Vol. 131. P. 77—85.

1453. *Stewart L. M. D., Booth I. R.* Na⁺ involvement in proline transport in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. Vol. 19. P. 161—164.
1454. *Stoeckenius W.* The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaebacterium // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10. P. 483—486.
1455. *Stoeckenius W., Khorana H. G., Oesterhelt D.* Rhodopsins // XIII Intern. Congr. Biochem. Abstr. Amsterdam. 1985. P. 625.
1456. *Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A.* Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria // *Biochim. et biophys. acta.* 1979. Vol. 505. P. 215—278.
1457. *Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R.* Bacteriorhodopsin photocycle and stoichiometry // *Chemiosmotic proton circuits in biological membranes* // Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 283—310.
1458. *Stolp H.* *Bdellovibrio bacteriovorus*—ein rauberischer Bacteriophagenparasit // *Naturwissenschaften.* 1958. Bd. 55. S. 57—63.
1459. *Stone D. K., Xie X.-S., Racker E.* An ATP-driven proton pump in clathrin-coated vesicles // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 4059—4062.
1460. *Stoppani A. O. M., de Briguone C. M. C., Briguone J. G.* Structural requirements for the action of steroids as inhibitors of electron transfer // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1968. Vol. 127. P. 463—475.
1461. *Stouthamer A. H.* Anaerobic electron transport in bacterial energy conversion // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 1—2.
1462. *Strid A., Nyren P., Boork J., Baltscheffsky M.* Kinetics of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum* chromatophores // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 196. P. 337—340.
1463. *Strieleman P. J., Schalinske K. L., Shrago E.* Fatty acid activation of the reconstituted brown adipose tissue mitochondria uncoupling protein // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 13402—13405.
1464. *Strittmatter P., Dailey H. A.* Essential structural features and orientation of cytochrome *b₅* in membranes // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 71—82.
1465. *Strittmatter P., Rogers M. J., Spatz L.* The binding of cytochrome *b₅* to liver microsomes // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 7188—7194.
1466. *Stucki J.* The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation // *Europ. J. Biochem.* 1980a. Vol. 109. P. 268—283.
1467. *Stucki J.* The thermodynamic-buffer enzymes // *Ibid.* 1980b. Vol. 109. P. 257—267.
1468. *Subczynski W. K., Hyde J. S.* Diffusion of oxygen in water and hydrocarbons using an electron spin resonance spin-label technique // *Biophys. J.* 1984. Vol. 45. P. 743—748.
1469. *Sugimoto J., Whitman M., Cantley G. L., Erikson K. L.* Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidyl inositol and diacylglycerol // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 2117—2121.
1470. *Sugiyama S., Matsukura H., Imae Y.* Relationship between Na⁺-dependent cytoplasmic pH homeostasis and Na⁺-dependent flagellar rotation and amino acid transport in alkalophilic *Bacillus* // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 182. P. 265—268.
1471. *Sugiyama S., Matsukura H., Koyama N., Nosoh Y., Imae Y.* Requirement of Na⁺ in flagellar rotation and amino-acid transport in a facultative alkalophilic *Bacillus* // *Biochim. et. biophys. acta.* 1986. Vol. 852. P. 38—45.
1472. *Summerhayes I. C., Lampidis T. J., Bernal S. D., Nadakavukaren J. J., Nadakavukaren K. K., Shepherd E. L., Chen L. B.* Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1982. Vol. 79. P. 5292—5296.

1473. *Sumper M., Träuble H.* Membranes as acceptors for palmitoyl CoA in fatty acid biosynthesis // *FEBS Lett.* 1973. Vol. 30. P. 29—34.
1474. *Sundberg S. A., Bogomolni R. A., Spudich J. L.* Selection and properties of phototaxis-deficient mutants of *Halobacterium halobium* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 164. P. 282—287.
1475. *Sutton R., Apps D. K.* Isolation of a DCCD-binding protein from bovine chromaffin granule membranes // *FEBS Lett.* 1981. Vol. 130. P. 103—106.
1476. *Suzuki H., King T. E.* Evidence of an ubisemiquinone radical(s) from the NADH-ubiquinone reductase of the mitochondrial respiratory chain // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258. P. 352—358.
1477. *Swan M. A.* Electron microscopic observations of structures associated with the flagella of *Spirillum volutans* // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 161. P. 1137—1145.
1478. *Szczesna-Kaczmarek A., Litwinska D., Popinigis J.* Oxidation of NADH via an «external» pathway in skeletal muscle mitochondria and its possible role in the repayment of lactacid oxygen debt // *Intern. J. Biochem.* 1984. Vol. 16. P. 1231—1235.
1479. *Takahashi T., Tomioka H., Kamo N., Kobatake Y.* A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1985. Vol. 28. P. 161—164.
1480. *Takahashi T., Watanabe M., Kamo N., Kobatake Y.* Negative phototaxis from blue light and the role of third rhodopsin-like pigment in *Halobacterium cutirubrum* // *Biophys. J.* 1985. Vol. 48. P. 235—240.
1481. *Takamiya K.* Properties of the cytochrome *c* oxidase activity of cytochromes *b₅₆₁* from photoanaerobically grown *Rhodopseudomonas sphaeroides* // *Plant. a. Cell. Physiol.* 1983. Vol. 24. P. 1457—1462.
1482. *Takamiya S., Furushima F., Oya H.* Electron transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria: I. Characterization of NADH-cytochrome *c* reductase (complex I—III), with special reference to cytochrome localization // *Mol. a. Biochem. Parasitol.* 1984. Vol. 13. P. 121—134.
1483. *Takamiya S., Furushima F., Oya H.* Electrontransfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. II. Succinate-coenzyme Q reductase (complex II) associated with substrate-reducible cytochrome *b₅₅₈* // *Biochim. et. biophys. acta.* 1986. Vol. 848. P. 99—107.
1484. *Takano T., Dickerson R. E.* Redox conformation changes in refined type cytochrome *c* // *Proc Nat. Acad. Sci. US.* 1980. Vol. 77. P. 6371—6375.
1485. *Takashige K., Shimmen T., Tazawa M.* Electrogenic pump current and ATP-dependent H⁺ efflux across the plasma membrane of *Nitellopsis obtusa* // *Plant. a. Cell. Physiol.* 1985. Vol. 26. P. 661—668.
1486. *Takemori S., Kominami S.* The role of cytochrome P-450 in adrenal steroidogenesis // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. P. 393—396.
1487. *Takeshige K., Minakami B.* Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent lipid peroxidation by beef heart mitochondria particles // *J. Biochem.* 1975. Vol. 77. P. 1067—1072.
1488. *Tamm S. L.* Flagellated ectosymbiotic bacteria propel a eucaryotic cell // *J. Cell. Biol.* 1982. Vol. 94. P. 697—709.
1489. *Tan Duc Nguyen, Siegenthaler P.-A.* Proteins and polypeptides of envelope membranes from spinach chloroplasts // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 164. P. 67—70.
1490. *Tanabe K.* Staining of *Plasmodium yoelli*-infected mouse erythrocytes with the fluorescent dye rhodamine 123 // *J. Protozool.* 1983. Vol. 30. P. 707—710.
1491. *Tanabe K.* Visualization of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*-infected mouse fibroblasts by the cationic permeant fluorescent dye rhodamine 123 // *Experientia.* 1985. Vol. 41. P. 101—102.

1492. Tanaka K., Kanbe T., Kuroiwa T. Three-dimensional behaviour of mitochondria during cell division and germ tube formation in the dimorphic yeast *Candida albicans* // J. Cell Sci. 1985. Vol. 73. P. 207—220.
1493. Tanaka K., Niiga S., Tsuchiya T. Melibiose transport in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1980. Vol. 141. P. 1031—1036.
1494. Tapiero H., Munck J.-N., Fourcade A., Lampidis T. J. Cross-resistance to rhodamine 123 in adriamycin- and daunorubicin-resistant field leukemia cell variants // Cancer Res. 1984. Vol. 44. P. 5544—5549.
1495. Taylor B. L. How do bacteria find the optimal concentration of oxygen? // Trends Biochem. Sci. 1983. Vol. 8. P. 438—441.
1496. Taylor M. E., Bogomolni R. A., Weber H. J. Purification of photochemically active halorhodopsin // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1983. Vol. 80. P. 6172—6176.
1497. Teather R. M., Bramhall J., Riede I., Wright J. K., Furst M., Aichele G., Wilhelm V., Overath P. Lactose carrier protein of *Escherichia coli*. Structure and expression of plasmids carrying the Y gene of the lac operon // Europ. J. Biochem. 1980. Vol. 108. P. 223—231.
1498. Teather R. M., Müller-Hill B., Abrutsch V., Aichele G., Overath P. Amplification of the lactose carrier protein in *Escherichia coli* using a plasmid vector // Mol. a. Gen. Genet. 1978. Vol. 159. P. 239—248.
1499. Tedeschi H. The transport of cations in mitochondria // Biochim. et biophys. acta. 1981. Vol. 639. P. 157—196.
1500. Teintze M., Slaughter M., Weiss H., Neupert W. Biogenesis of mitochondrial ubiquinol: cytochrome *c* reductase (cytochrome *bc₁* complex) // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 10364—10371.
1501. Teissie J. Adenosine 5'-triphosphate synthesis in *Escherichia coli* submitted to a microsecond electric pulse // Biochemistry. 1986. Vol. 25. P. 368—373.
1502. Teissie J., Knox B. E., Tsong T. Y., Wehrle J. Synthesis of adenosine triphosphate in respiration-inhibited submitochondrial particles induced by microsecond electric pulses // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1981. Vol. 78. P. 7473—7477.
1503. Thalenfeld B. E., Tzagoloff A. Assembly of the mitochondrial membrane system. Sequence of the Oxi 2 gene of yeast mitochondrial DNA // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 6173—6180.
1504. Thaylor P. W., Kroll H.-P. Interaction of human complement proteins with serum-sensitive and serum-resistant strains of *Escherichia coli* // Mol. Immunol. 1984. Vol. 21. P. 609—620.
1505. Thorner J. P., Cogdell R. J., Sefton R. E. B., Webster G. D. Further studies on the composition and spectral properties of the photochemical reaction centers of bacteriochlorophyll *b*-containing bacteria // Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol. 593. P. 60—75.
1506. Tiede D. M. Incorporation of membrane proteins into interfacial films: model membranes for electrical and structural characterization // Ibid. 1985. Vol. 811. P. 357—379.
1507. Tokuda H. Solubilization and reconstitution of the Na⁺-motive NADH oxidase activity from the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // FEBS Lett. 1984. Vol. 176. P. 125—128.
1508. Tokuda H., Nakamura T., Unemoto T. Potassium ion is required for the generation of pH-dependent membrane potential and ΔpH by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // Biochemistry. 1981. Vol. 20. P. 4198—4203.
1509. Tokuda H., Sugawara M., Unemoto T. Role of Na⁺ and K⁺ in α-aminoisobutyric acid transport by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 788—794.
1510. Tokuda H., Udagawa T., Unemoto T. Generation of the electrochemical potential of Na⁺ by the Na⁺-motive NADH oxidase in inverted membrane vesicles of *Vibrio alginolyticus* // FEBS Lett. 1985. Vol. 183. P. 95—98.

1511. Tokuda H., Unemoto T. A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1981. Vol. 102. P. 265—271.
1512. Tokuda H., Unemoto T. Characterization of the respiration-dependent Na⁺ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 10007—10014.
1513. Tokuda H., Unemoto T. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na⁺ pump functions // J. Bacteriol. 1983. Vol. 156. P. 636—643.
1514. Tokuda H., Unemoto T. Na⁺ is translocated at NADH: quinone oxidoreductase segment in the respiratory chain of *Vibrio alginolyticus* // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 258. P. 7785—7790.
1515. Tokuda H., Unemoto T. The Na⁺-motive respiratory chain of marine bacteria // Microbiol. Sci. 1985. Vol. 2. P. 65—71.
1516. Toll L., Howard B. D. Role of Mg²⁺—ATPase and a pH gradient in the storage of catecholamines in synaptic vesicles // Biochemistry. 1978. Vol. 17. P. 2517—2523.
1517. Tonsgard J. H., Getz G. S. Effect of Reye's syndrome serum on isolated chinchilla liver mitochondria // J. Clin. Invest. 1985. Vol. 76. P. 816—825.
1518. Trelstad R. L., Revel J., Hay E. D. Tight junctions between cells in the early chick embryo as visualized with electron microscope // J. Cell Biol. 1966. Vol. 31. P. c6—c10.
1519. Trissl H.-W. Light-induced conformational changes in cattle rhodopsin as probed by measurements of the interface potential // Photochem. a. Photobiol. 1979. Vol. 29. P. 579—588.
1520. Trissl H.-W. On the rise time of the R₁-component of the early receptor potential: evidence for a fast lightinduced charge separation in rhodopsin // Biophys. Struct. Mech. 1982. Vol. 8. P. 213—230.
1521. Trissl H.-W., Kunze U. Primary electrogenic reactions in chloroplasts probed by picosecond flash-induced dielectric polarization // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 806. P. 136—144.
1522. Trumpower B. L. Evidence for a protonmotive Q-cycle mechanism of electron transfers through the cytochrome *bc₁* complex // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1976. Vol. 70. P. 73—80.
1523. Trumpower B. L. Further tests of the protonmotive Q-cycle and associated proton translocation in the cytochrome *bc₁* complex of the respiratory chain // III Europ. Bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 25—26.
1524. Tsuchiya T., Ottina K., Moriyama Y., Newman M. J., Wilson T. H. Solubilization and reconstitution of the melibiose carrier from a plasmid-carrying strain of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 5125—5128.
1525. Tsuchiya T., Shinoda S. Respiration-driven Na⁺ pump and Na⁺ circulation in *Vibrio parahaemolyticus* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 162. P. 794—798.
1526. Tsuchiya T., Wilson T. H. Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of *Escherichia coli* // Membrane Biochem. 1978. Vol. 2. P. 63—79.
1527. Tsuda M., Hazemoto N., Kondo M., Kamo N., Kobatake Y., Terayama Y. Two photocycles in *Halobacterium halobium* that lacks bacteriorhodopsin // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 108. P. 970—976.
1528. Tsuda M., Nelson B., Chang C.-H., Govindjee R., Erbey T. G. Characterization of the chromophore of the third rhodopsin-like pigment of *Halobacterium halobium* and its photoproduct // Biophys. J. 1985. Vol. 47. P. 721—724.
1529. Tsudzuki T. Studies on the uptake of [³H] dopamine by synaptic vesicle fraction isolated from bovine brain // J. Biochem. 1981. Vol. 89. P. 61—69.

1530. *Tsuprun V. L., Mesyanzhinova I. V., Kozlov I. A., Orlova E. V.* Electron microscopy of beef heart mitochondrial F_1 -ATPase // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 167. P. 285—290.
1531. *Tzagoloff A.* Mitochondria. N.Y., L.: Plenum press, 1982. 342 p.
1532. *Uchida E., Ohsumi Y., Anraku Y.* Purification and properties of H^+ -translocating, Mg^{2+} -adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 1090—1095.
1533. *Udagawa T., Unemoto T., Tokuda H.* Generation of Na^+ electrochemical potential by the Na^+ -motive NADH oxidase and Na^+/H^+ antiport system of a moderately halophilic *Vibrio costicola* // *Ibid.* 1986. Vol. 261. P. 2616—2622.
1534. *Uden G., Hackenberg H., Kröger A.* Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes* // *Biochim. et biophys. acta.* 1980. Vol. 591. P. 275—288.
1535. *Uden G., Kröger A.* Reconstitution in liposomes of the electron-transport chain catalyzing fumarate reduction by formate // *Ibid.* 1982. Vol. 682. P. 258—263.
1536. *Unemoto T., Hayashi M.* NADH: quinone oxidoreductase as a site of Na^+ -dependent activation in the respiratory chain of marine *Vibrio alginolyticus* // *J. Biochem.* 1979. Vol. 85. P. 1461—1467.
1537. *Unemoto T., Hayashi M.* Subunit structure and electron transfer pathway in the sodium transport NADH: quinone reductase of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* // *EBEC* 1986. Vol. 4. P. 68.
1538. *Unemoto T., Hayashi M., Hayashi M.* Na^+ -dependent activation of NADH oxidase in membrane fraction from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V. costicola* // *J. Biochem.* 1977. Vol. 82. P. 1389—1395.
1539. *Unwin P. N. T., Henderson R.* Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 94. P. 425—440.
1540. *Uratani Y.* Solubilization and reconstitution of sodium-dependent transport system for branched-chain amino acids from *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 10023—10026.
1541. *Van Dam K., Woelders H., Colen A., Westerhoff H. V.* A structural basis for mosaic protonic energy coupling // *Biochem. Soc. Trans.* 1984. Vol. 12. P. 401—402.
1542. *Van der Bend R. L., Duetz W., Colen A.-M. A. E., Van Dam K., Berden J. A.* Differential effects of triphenyltin and 8-azido-ATP on the ATP synthesis, $ATP \rightarrow P_i$ exchange, and ATP hydrolysis in liposomes containing ATP synthase and bacteriorhodopsin // *Arch. Biochem. a. Biophys.* 1985. Vol. 241. P. 461—471.
1543. *Van Dyke R. W., Hornick C. A., Belcher J., Scharschmidt B. F., Havel R. J.* Identification and characterization of ATP-dependent proton transport by rat liver multivesicular bodies // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 11021—11026.
1544. *Van Dyke R. W., Steer C. J., Scharschmidt B. F.* Clathrin-coated vesicles from rat liver: enzymatic profile and characterization of ATP-dependent proton transport // *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 1984. Vol. 81. P. 3108—3112.
1545. *Van Gelder B. F., Beinert H.* Studies of the heme components of cytochrome *c* oxidase by EPR spectroscopy // *Biochim. et biophys. acta.* 1969. Vol. 189. P. 1—24.
1546. *Van Kooten O.* Intermembrane space and the mechanism of biological free energy transduction // *Trends Biochem. Sci.* 1984. Vol. 9. P. 221—222.
1547. *Van Nieuwenhoven M. H., Hellingwerf K. J., Venema G., Konings W. N.* Role of proton motive force in genetic transformation of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1982. Vol. 151. P. 771—776.

1548. *Van Walraven H. S., Krab K., Hagendoorn M. J. M., Kraayenhof R.* The use of carotenoids and oxonol VI as probes for membrane potential in proteoliposomes // *FEBS Lett.* 1985. Vol. 184. P. 96—99.
1549. *Vandenberg C. A., Montal M.* Light-regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. 2. Light regulated phosphorylation of rhodopsin and phosphoinositides in squid photoreceptor membranes // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 2347—2352.
1550. *Vanderkooi J. M., Landesberg R., Hayden G. W., Owen C. S.* Metal-free and metal-substituted cytochrome *c*. Use in characterization of the cytochrome *c* binding site // *Europ. J. Biochem.* 1977. Vol. 81. P. 339—347.
1551. *Vartapetian B. B., Andreeva I. N., Kozlova G. I., Agapova L. P.* Mitochondrial ultrastructure in roots of mesophyte and hydrophyte at anoxia and after glucose feeding // *Protoplasma.* 1977. Vol. 91. P. 243—256.
1552. *Veerman A., Overmeer W. P. J., Van Zon A. Q., de Boer J. M., de Ward E. R., Huisman H. O.* Vitamin A is essential for photoperiodic induction of diapause in an eyeless mite // *Nature.* 1983. Vol. 302. P. 248—249.
1553. *Vignais P. V., Block M. R., Boulay F., Brandolin G., Lauquin G. J. M.* Functional and topological aspects of the mitochondrial adenine-nucleotide carrier // *Membranes and transport* / Ed. A. N. Martonosi. N. Y.; L. Plenum press, 1982. Vol. 1. P. 405—414.
1554. *Vignais P. V., Block M. R., Boulay F., Brandolin G., Lauquin G. J. M.* Molecular aspects of structure-function relationships in mitochondrial adenine nucleotide carrier // *Structure and properties of cell membranes* / Ed. V. Bengha. Paris: CRC press, 1985. Vol. 11. P. 139—179.
1555. *Vigne P., Frelin C., Lazdunski M.* The Na^+ -dependent regulation of the internal pH in chick skeletal muscle cells. The role of the Na^+/H^+ exchange system and its dependence on internal pH // *EMBO J.* 1984. Vol. 3. P. 1865—1870.
1556. *Villalobo A., Boutry M., Goffeau A.* Electrogenic proton translocation coupled to ATP hydrolysis by the plasma membrane Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 12081—12087.
1557. *Villiers C., Michejda J. W., Block M., Lauquin G. J. M., Vignais P. V.* The electrogenic nature of ADP/ATP transport in inside-out submitochondrial particles // *Biochim. et biophys. acta.* 1979. Vol. 546. P. 157—170.
1558. *Vinogradov A. D.* Further development of the concept of pseudoreversibility of mitochondrial ATP-synthase // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 373—374.
1559. *Vinogradov A. D.* Steady state kinetics of the ATP hydrolysis and synthesis by mitochondrial ATP synthase complex // XVI FEBS Meet. Abstr. Moscow. 1984. P. 68.
1560. *Von Meyenburg K., Jorgensen B. B., Nielsen J., Hansen F. G.* Promoters of the apt operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Th10 insertion mutations // *Mol. a. Gen. Genet.* 1982. Vol. 188. P. 240—248.
1561. *Vorobjev I. A., Zorov D. B.* Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 163. P. 311—314.
1562. *Vredenberg W. J.* Electrical interactions and gradients between chloroplast compartments and cytoplasm // *The intact chloroplast* / Ed. J. Barber. Amsterdam: Elsevier, 1976. P. 53—86.
1563. *Wagner G., Hartmann R., Oesterheld D.* Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium* // *Europ. J. Biochem.* 1978. Vol. 89. P. 169—179.

1564. Wakabayashi S., Matsubara H., Kim C. H., Kawai K., King T. E. The complete amino acid sequence of bovine heart cytochrome c_1 // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1980. Vol. 97. P. 1548—1554.
1565. Wakabayashi S., Takao T., Shimonishi Y., Kuramitsu S., Matsubara H., Wang T., Zhang Z., King T. E. Complete amino acid sequence of the ubiquinone binding protein (QP-C), a protein similar to the 14,000 dalton subunit of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 337—343.
1566. Wakabayashi S., Takeda H., Matsubara H., Kim C. H., King T. E. Identity of the heme-not-containing protein in bovine heart cytochrome c_1 preparation with the protein mediating c_1 - c complex formation — A protein with high glutamic acid content // J. Biochem. 1982. Vol. 91. P. 2077—2085.
1567. Walker J. E., Cozens A. L., Dyer M., Fearnley J. M., Powell S., Runswick M. J., Tybulewicz L. J. Genes for ATP synthases from photosynthetic bacteria, chloroplasts and mitochondria // IV Europ. bioenerg. conf. Prague, 1986. P. 1.
1568. Walker J. E., Fearnley J. M., Gay N. J., Gibson B. W., Northrop F. D., Powell S. J., Runswick M. J., Saraste M., Tybulewicz L. J. Primary structure and subunit stoichiometry of F_1 -ATPase from bovine mitochondria // J. Mol. Biol. 1985. Vol. 184. P. 677—701.
1569. Walker J. E., Runswick M. J., Saraste M. Subunit equivalence in *Escherichia coli* and bovine heart mitochondrial F_1F_0 -ATPases // FEBS Lett. 1982. Vol. 146. P. 393—396.
1570. Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold // EMBO J. 1982. Vol. 1. P. 945—951.
1571. Waloga G., Anderson R. E. Effects of inositol-1,4,5-triphosphate injections into salamander rods // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1985. Vol. 126. P. 59—62.
1572. Walsh M. L., Jen J., Chen L. B. Transport of serum components into structures similar to mitochondria // Cold Spring Harbor Conf. Prolif. 1979. Vol. 6. P. 513—520.
1573. Walter P., Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum // Nature. 1982. Vol. 299. P. 691—698.
1574. Wang Y., Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and mitochondrial H^+ -ATPases of oat roots // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 10434—10443.
1575. Warncke J., Slayman C. L. Metabolic modulation of stoichiometry in a proton pump // Biochim. et biophys. acta. 1980. Vol. 591. P. 224—233.
1576. Watanabe A., Price C. A. Translation of mRNAs for subunit of chloroplast coupling factor 1 in spinach // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 6304—6308.
1577. Watanabe T., Kobayakshi M., Hongu A., Nakazato M., Hiyama T., Murata N. Evidence that a chlorophyll a dimer constitutes the photochemical reaction centre 1 (P700) in photosynthetic apparatus // FEBS Lett. 1985. Vol. 191. P. 252—257.
1578. Waterbury J. B., Willey J. M., Franks D. G., Valois F. W., Watson S. W. A cyanobacterium capable of swimming motility // Science. 1985. Vol. 230. P. 74—76.
1579. Webb M. R., Grubmeyer C., Penefsky H. S., Trenthams D. R. The stereochemical course of phosphoric residue transfer catalyzed by beef heart mitochondrial ATPase // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255. P. 11637—11639.
1580. Webster D. A., Hackett D. P. Respiratory chain of colorless algae. I. Chlorophyta and Euglenophyta // Plant Physiol. 1965. Vol. 40. P. 1091—1100.

1581. Weinstein J. N., Blumenthal R., Van Renswoude J., Kempf C., Klausner R. D. Charge clusters and orientation of membrane proteins // J. Membrane Biol. 1982. Vol. 66. P. 203—212.
1582. West J. C. Lactose transport coupled to proton movements in *Escherichia coli* // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1970. Vol. 41. P. 655—661.
1583. West J. C. The biochemistry of membrane transport. L.; N. Y.: Chapman and Hall, 1983. 80 p.
1584. West J. C., Mitchell P. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli* // Biochem. J. 1974. Vol. 144. P. 87—90.
1585. West J. C., Mitchell R., Moody A. J., Mitchell P. Proton translocation by cytochrome oxidase in (antimycin + myxothiazol)-treated rat liver mitochondria using ferrocyanide or hexammineruthenium as electron donor // Ibid. 1986. Vol. 236. P. 15—21.
1586. Westerhoff H. V., Helgerson S. L., Theg S. M., Van Kooten O., Wikström M., Skulachev V. P., Dancshazy Z. The present state of the chemiosmotic coupling theory // Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung. 1983. Vol. 18. P. 125—149.
1587. Westhoff G., Alt J., Nelson N., Herrmann R. C. Genes and transcripts for the ATP synthase CF_0 subunits I and II from spinach thylakoid membranes // Mol. a. Gen. Genet. 1985. Vol. 199. P. 290—299.
1588. Weyer K. A., Schäfer W., Lottspeich F. The cytochrome subunit of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* is a lipoprotein // Biochemistry. 1987. Vol. 26. P. 2909—2914.
1589. Widger W. R., Cramer W. A., Hermodson M., Herrmann R. G. Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplast cytochrome b_{559} // FEBS Lett. 1985. Vol. 191. P. 186—190.
1590. Widger W. R., Cramer W. A., Herrmann R. G., Trebst A. Sequence homology and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b_6-f complex: Position of the cytochrome b hemes in the membrane // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1984. Vol. 81. P. 674—678.
1591. Wieczorek L., Altendorf K. Potassium transport in *Escherichia coli*. Evidence for a K^+ transport adenosine-5'-triphosphatase // FEBS Lett. 1979. Vol. 98. P. 233—236.
1592. Wiemken V., Backofen R. Probing the smallest functional unit of the reaction center of *Rhodospirillum rubrum* G-9 with proteinases // Ibid. 1984. Vol. 166. P. 155—159.
1593. Wikström M. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria // Nature. 1977. Vol. 266. P. 271—273.
1594. Wikström M. Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone // FEBS Lett. 1984. Vol. 169. P. 300—304.
1595. Wikström M., Casey R. The oxidation of exogenous cytochrome c by mitochondria. Resolution of a long-standing controversy // Ibid. 1985. Vol. 183. P. 293—298.
1596. Wikström M., Krab K., Saraste M. Cytochrome oxidase — a synthesis. L.: Acad. press, 1981. 198 p.
1597. Wikström M., Saraste M. The mitochondrial respiratory chain // Bioenergetics / Ed. L. Ernster. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 49—94.
1598. Wikström M., Saraste M., Penttilä T. Relationships between structure and function in cytochrome oxidase // The enzymes of biological membranes / Ed. A. N. Martonosi. L.: Plenum press, 1985. Vol. 4. P. 111—148.
1599. Wilkins J. A., Salganicoff L. Participation of a transmembrane proton gradient in 5-hydroxytryptamine transport by platelet dense granules and dense-granule ghosts // Biochem. J. 1981. Vol. 198. P. 113—123.

1600. Williams J. C., Steiner L. A., Ogden R. C., Simon M. J., Feher G. Primary structure of the M subunit of the reaction center from Rhodospseudomonas sphaeroides // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1983. Vol. 80. P. 6505—6509.
1601. Williams R. J. P. Possible functions of chains of catalysts // J. Theor. Biol. 1961. Vol. 1. P. 1—13.
1602. Williams R. J. P. The nature of local chemical potentials. A comment on a letter by professor V. P. Skulachev // FEBS Lett. 1983. Vol. 150. P. 1—3.
1603. Wilson R. H., Smith B. N. Uncoupling of Sauromatum spadix mitochondria as a mechanism of thermogenesis // Ztschr. Pflanzenphysiol. 1971. Vol. 65. P. 124—129.
1604. Winkler H., Carmichael S. W. The chromaffin granule // The secretory granule / Ed. A. M. Poisner, J. M. Trifaro. Amsterdam: Elsevier Biomed. press, 1982. P. 3—79.
1605. Winkler H. H., Daughert R. M. Regulatory role of phosphate and other anions in transport of ADP and ATP by Rickettsia prowazekii // J. Bacteriol. 1984. Vol. 160. P. 76—79.
1606. Wise J. G., Senior A. E. Catalytic properties of the Escherichia coli proton adenosinetriphosphatase: evidence that nucleotide bound at non-catalytic sites is not involved in regulation of oxidative phosphorylation // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 6949—6954.
1607. Witt H. T. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. The central role of the electric field // Biochim. et biophys. acta. 1979. Vol. 505. P. 335—427.
1608. Witt H. T. On the molecular machine of photosynthesis: overview and some recent results // Chemiosmotic proton circuits in biological membranes // Ed. V. P. Skulachev, P. C. Hinkle. L.: Addison-Wesley, 1981. P. 221—243.
1609. Witt H. T., Schlodder E., Graber P. Membrane-bound ATP synthesis generated by an external electric field // FEBS Lett. 1976. Vol. 69. P. 272—276.
1610. Wittaker V. P. Biophysical and biochemical studies of isolated cholinergic vesicles from Torpedo marmorata // Fed. Proc. 1982. Vol. 41. P. 2759—2764.
1611. Wittenberg B. A., Wittenberg J. B. Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocytes // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 6548—6554.
1612. Wohlfarth G., Buckel N. A sodium ion gradient as energy source for Peptostreptococcus asaccharolyticus // Arch. Microbiol. 1985. Vol. 142. P. 128—135.
1613. Wohlrab H. Inhibitor-sensitivity of the reconstituted mitochondrial phosphate transporter // I Europ. bioenerg. conf. Bologna, 1980. P. 301.
1614. Wohlrab H., Collins A., Costello D. Unidirectional phosphate transport catalyzed by improved mitochondrial phosphate transport protein liposomes // Biophys. J. 1983. Vol. 41. P. 326.
1615. Wohlrab H., Flowers N. pH-gradient-dependent phosphate transport catalyzed by the purified mitochondrial phosphate transport protein // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 28—31.
1616. Wojtczak L., Boguska K., Sarsala M. G., Zaluska H. Effect of fatty acids on energy metabolism and the transport of adenine nucleotides in mitochondria and other cellular structures // Proc. V FEBS Meet. Madrid, 1969. Vol. 17. P. 79—87.
1617. Wojtczak L., Zaluska H. The inhibition of translocation of adenine nucleotides through mitochondrial membranes by oleate // Biochim. et biophys. acta. 1967. Vol. 28. P. 76—81.
1618. Woldegiorgis G., Voss S., Shrago E., Werner-Washburne M., Keegstra K. Adenine nucleotide translocase-dependent anion transport in pea chloroplasts // Ibid. 1985. Vol. 810. P. 340—345.

1619. Wolfe R. S. Unusual coenzymes of methanogenesis // Trends Biochem. Sci. 1985. Vol. 10. P. 396—399.
1620. Wolff C., Buchwald H.-E., Riippel H., Witt K., Witt H. T. Rise time of the light-induced electrical field across the function membrane of photosynthesis. Registration by repetitive laser giant pulse photometry // Ztschr. Naturforsch. B. 1969. Vol. 24. P. 1038—1041.
1621. Wolff E. K., Bogomolni R. A., Scherrer P., Hess B., Stoekenius W. Color discrimination in halobacteria: spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986. Vol. 83. P. 7272—7276.
1622. Wood H. G., Goss N. H. Phosphorylation enzymes of the propionic acid bacteria and the roles of ATP, inorganic pyrophosphate, and polyphosphates // Ibid. 1985. Vol. 82. P. 312—315.
1623. Wood P. M. Why do c-type cytochrome exist? // FEBS Lett. 1983. Vol. 164. P. 223—226.
1624. Wood P. M. Bacterial proteins with co-binding b- or c-type haem: functions and absorption spectroscopy // Biochim. et biophys. acta. 1984. Vol. 768. P. 293—317.
1625. Woodruff M., Fain G. L. Ca²⁺-dependent changes in cGMP levels are not correlated with opening and closing of the light-dependent permeability of toad photoreceptors // J. Gen. Physiol. 1982. Vol. 80. P. 537—555.
1626. Wright J. K. The lactose: H⁺ carrier of E. coli. Mechanism and structure of a biological energy transfer // XVII Spec. FEBS Meet. Abstr. Albufeira, 1985. P. 31.
1627. Wright J. K. The kinetic mechanism of galactoside/H⁺ cotransport in Escherichia coli // Biochim. et biophys. acta. 1986. Vol. 801. P. 391—416.
1628. Wright J. K., Overath P. Purification of the lactose: H⁺ carrier of Escherichia coli and characterization of galactoside binding and transport // Europ. J. Biochem. 1984. Vol. 138. P. 497—508.
1629. Wu L. N. J., Fisher R. R. Subunit-structure of submitochondrial particle membrane transhydrogenase // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 7847—7851.
1630. Wu L. N. J., Pennington R. M., Everett T. D., Fisher R. R. An improved method for the purification of bovine heart mitochondrial transhydrogenase // Ibid. 1982. Vol. 257. P. 4052—4055.
1631. Xie X.-S., Stone D. K. Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex // Ibid. 1986. Vol. 261. P. 2492—2495.
1632. Xie X.-S., Stone D. K., Racker E. Determinants of clathrin-coated vesicle acidification // Ibid. 1983. Vol. 258. P. 14834—14838.
1633. Xie X.-S., Stone D. K., Racker E. Activation and partial purification of the ATPase of clathrin-coated vesicles and reconstitution of the proton pump // Ibid. 1984. Vol. 259. P. 11676—11678.
1634. Yagi T. Purification and characterization of the NADH dehydrogenase complex of Paracoccus denitrificans // IV Europ. bioenerg. conf. Prague, 1986. P. 175.
1635. Yaguzhinsky L. S., Smirnova E. G., Ratnikova L. A., Kolesova G. M., Krasinskaya I. P. Hydrophobic sites of the mitochondrial electron transfer system // J. Bioenerg. 1973. Vol. 5. P. 163—174.
1636. Yamashiro D. J., Fluss S. R., Marfield F. R. Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump // J. Cell Biol. 1983. Vol. 97. P. 929—934.
1637. Yanagita Y., Sone N., Kagawa Y. Proton pumping and oxidase activity of thermophilic cytochrome oxidase remain after its extensive proteolysis // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1983. Vol. 113. P. 575—580.

1638. Yang X., Trumppower B. L., Purification of a threesubunit ubiquinol — cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans* // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 12282—12289.
1639. Yoshida Y., Hashimoto T., Kimura H., Sakakibara S., Tagawa K. Interaction with mitochondrial membranes of a synthetic peptide with a sequence common to extra peptides of mitochondrial precursor proteins // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1985. Vol. 128. P. 775—780.
1640. Yoshioka T., Inoue H., Hotta Y. Absence of phosphatidylinositol phosphodiesterase in the head of a *Drosophila* visual mutant, norp A (no-receptor potential A) // J. Biochem. 1985. Vol. 97. P. 1251—1254.
1641. Youmans S. J., Worman H. J., Brodsky W. A. ATPase activity and ATP-dependent proton translocation in plasma membrane vesicles of turtle bladder epithelial cells // Biochem. et biophys. acta. 1983. Vol. 730 P. 173—177.
1642. Young L. D.-E., Cohn Z. A. Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: characterization of a pore-forming protein (PFP) // J. Cell Biochem. 1985. Vol. 29. P. 299—308.
1643. Young L. D.-E., Unkeless J. C., Cohn Z. A. Functional ion channel formation by mouse macrophage IgG Fc receptor triggered by specific ligands // Ibid. P. 289—297.
1644. Zhang F., Schneider D. L. The bioenergetics of Golgi apparatus function: evidence for an ATP-dependent proton pump // Biochem. a. Biophys. Res. Commun. 1983. Vol. 114. P. 620—625.
1645. Zhu Q. S., Berden J. A., Slater E. C. A myxothiasol — sensitive Q-binding protein isolated from *Chromatium vinosum* // Biochim. et biophys. acta. 1983. Vol. 724. P. 184—190.
1646. Ziegler D., Lester R., Green D. E. Oxidative phosphorylation by an electron transport particle from beef heart // Ibid. 1956. Vol. 21. P. 80—83.
1647. Ziegler D. M., Doeg K. A. Studies of the electron transport system. XLIII. The isolation of a succinicoenzyme Q reductase from beef heart mitochondria // Arch. Biochem. a. Biophys. 1962. Vol. 97. P. 41—50.
1648. Zimmermann R., Wickner W. Energetics and intermediates of the assembly of protein OmpA into the outer membrane of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 3920—3925.
1649. Zimniak P., Barnes E. M. Characterization of a calcium proton antiporter and an electrogenic calcium transporter in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii* // Ibid. 1980. Vol. 255. P. 10140—10143.
1650. Zingoni J., Or Y. S., Crouch R. K. Effect of variation of retinal polyene side-chain length on formation and function of bacteriorhodopsin analogue pigments // Biochemistry. 1986. Vol. 25. P. 2022—2027.
1651. Zoratti M., Favaron M., Pietroboron D., Azzone G. F. Mitochondrial proton pump «slip» // III Europ. bioenerg. conf. Hannover, 1984. Vol. A. P. 283—284.
1652. Zurawski G., Bohnert H. J., Whitfield P. R., Bottomley W. Nucleotide sequence of the gene for the M_r 32, 000 thylakoid membrane protein from Spinach oleracea and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of M_r 38,950 // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79. P. 7699—7703.
1653. Zwizinski C., Neupert W. Precursor proteins are transported into mitochondria in the absence of proteolytic cleavage of the additional sequences // J. Biol. Chem. 1983. Vol. 258. P. 13340—13346.
1654. Zwizinski C., Schleyer M., Neupert W. Transfer of proteins into mitochondria. Precursor to the ADP/ATP carrier binds to receptor sites on isolated mitochondria // Ibid. P. 4071—4074.

Предметный указатель

- Авидин 380
 Аденилаткиназа 183, 273, 310
 Аденилатциклаза 183, 441
 Аденилимидодифосфат (AMPPNP) 233
 Аденин, редокс-свойства 18
 Аденозин-5'-дифосфат (ADP) 16, 17, 224
 — вкусовое восприятие слепнем 334
 — диальдегидное производное (oADP) 231
 — ингибирование F_1 -АТРАЗы 222
 — и разобщение жирными кислотами 302
 Аденозин-5'-монофосфат (AMP) 18
 Аденозин-3',5'-монофосфат(циклический) (сAMP) 183, 310, 329, 330, 333, 412
 Аденозин-5-трифосфат (АТФ)
 — в хромаффинных гранулах 201
 — как нейротрансмиттер 334
 — конвертируемая энергетическая валюта 12, 13, 15—19
 — синтазы, H^+ - и Na^+ -зависимые — см. соответственно
 АТФ-синтаза, H^+ и Na^+
 — синтез из ацетилфосфата 431
 — — поддерживаемый искусственно созданной ΔpH 438
 — — ультрафиолетовым облучением 18
 Аденозинтрифосфатаза
 — транспортирующая Ca^{2+} — см. АТРаза, Ca^{2+}
 — Cl^- — см. АТРаза, Cl^-
 — E_1E_2 -типа 195, 197, 204
 — F_0F_1 -типа 195—197
 — H^+ — см. АТРаза, H^+
 — H^+/K^+ — см. АТРаза, H^+/K^+
 — K^+ — см. АТРаза, K^+
 — Na^+ — см. АТРаза, Na^+
 — Na^+/K^+ — см. АТРаза, Na^+/K^+
 Аденозинтрифосфатсинтаза
 — транспортирующая H^+ — см. H^+ — АТФ-синтаза
 — транспортирующая Na^+ — см. Na^+ — АТФ-синтаза
 ADP — см. Аденозин-5'-дифосфат
 ADP (АТФ), H^+ -симпортёр 270
 ADP/PP $_i$ -антипорт 268
 Адrenalин 183, 201
 Адrenalин/2H $^+$ -антипорт 183
 Адренодоксин 272, 321
 — редуктаза 273
 Адренорецепторы 183, 409, 410
 Адриамицин 25, 270
 Азид 199, 221, 232
 Азолектин 229
 Актomioзин 17, 271, 298, 376
 Aquaspirillum serpenae 289
 Аламетицин 281
 Алифатические спирты 21, 162
 Алкалофилы 179, 229, 393, 399, 402
 Алкогольдегидрогеназа 278
 Альдостерон 321
 Амилорид 372, 382, 392, 427
 α -Аминоизобутират 388
 Аминокислот транспорт 248, 263
 β -Аминолевулинатсинтаза 273
 Амфитал 142, 313
 AMP — см. Аденозин-5'-монофосфат
 Амфотерицин 298
 Anacystis nidulans 384
 Ансерин 206, 375—378
 Антенна светособирающая 35, 83, 333, 335
 Антимицин А 94, 120, 316, 320, 423, 428
 Антипортёр дикарбоксилатов 325—327
 Антипортёр K^+/H^+ 36, 283, 328
 Антипортёр HPO_4^{2-} /малат $^{2-}$ 254
 Aplysia californica 188, 508
 Аппарат Гольджи, мембраны 10, 25, 193, 194, 197, 243
 Арахидоновая кислота 409—412
 Аргининфосфаткиназа 17
 Арсенат 285, 399, 419
 Арсенит 419
 Arum italicum 315
 Arum maculatum 315
 Археобактерии 23, 188
 Асилаогликопротеида рецептор 281
 Аскарда 144
 Аскорбат 88, 101, 149—151, 321, 423
 Аспарат: глутамат-аминотрансфераза 273, 283, 326
 Аспартилфосфатный интермедиат 197, 203
 Асцит 338, 426—428

- Асцитная карцинома Эрлиха 205
 Атебрин 45
 АТР — см. Аденозин-5'-трифосфат
 АТР/ADP-антипорт 149, 216, 229, 250, 255, 266—269, 272, 279, 285, 302—306, 328, 330, 426
 АТР—ADP-транслоказа — см. АТР/ADP-антипорт
 АТРаза, Ca^{2+} 11, 195, 203, 400, 419
 АТРаза, Cl^- 419
 АТРаза, H^+
 — в анаэробных бактериях 194—199, 202, 383—386
 — в мембранах Гольджи 202, 206
 — в окаймленных пузырьках 202, 203
 — в плазмалемме клеток почки 202, 206
 — в хромоффиновых гранулах 202, 205, 206, 440
 — в протеолипосомах 202
 — в эпителии мочевого пузыря 202, 206
 — классификация 193, 194
 — лизосомная 194, 205
 — определение 193
 — плазмалемная 193—203, 440
 — — в протеолипосомах 197
 — — отношение H^+/ATP 197
 — — регуляция pH 330
 — типа E_1E_2 194
 — типа F_0F_1 194—199
 — тонопласта 194—203, 440, 447
 — эндоплазматического ретикулума 202, 205
 — эндосомная 202, 205
 АТРаза, H^+/K^+ 11, 194, 203—205, 417
 АТРаза, K^+ 36, 249, 250, 417, 436
 АТРаза, Na^+
 — бактериальная 385, 394—405, 413—416
 — животная 386, 416
 АТРаза, Na^+/K^+ 11, 12, 183, 194, 205, 386—388, 400, 417, 426, 427, 440
 АТР-синтаза, H^+
 — в плоской фосфолипидной мембране 229
 — в промитохондриях 280
 — в протеолипосомах 12, 28, 88, 104, 110, 144, 229, 230, 437
 — в системе протеолипосомы — мембранный фильтр 33, 228
 — в тилакоиде 95
 — в хлоропластах 96, 218, 229, 230, 237, 335
 — в хромофорах 77
 — в цианобактериях 123, 222
 — ген 207
 — концентрация в митохондриальной мембране 242
 — механизм 228—230
 — митохондриальная 217—219, 230
 — определение 195, 207
 — открытие 440
 — отношение H^+/ATP 197
 — потребность в двухвалентных катионах 199
 — реконструкция 218
 — субъединицы 206—209
 — трехмерная структура 218—220
 — у *E. coli* 207—209
 АТР-синтаза Na^+ 394—398, 400, 413, 440
 Атрактилозид 266—269
 Аттрактанты 290, 331—339
 Ауксин 330, 331, 413
 Аувертин 221, 386
Acholeplasma laidlawii 386
 Ацетил- CoA 310, 311
 Ацетилфосфат 431
 — киназа 431
 Ацетоацетат 101
 Ацетоацетил- CoA -тиолаза 273
Acidoaminococcus fermentans 380, 413
 Ацидоз 423
 Ацидофилы 230, 385, 388, 402
Acinetobacter calcoaceticus 41
 Аэротаксис 332
 Бактериоид 199
 Бактериородопсин
 — аминокислотная последовательность 155, 448
 — антитела 155
 — аспартат, необходимый для активности 167—169
 — в аттрактантном эффекте света 177, 178
 — в протеолипосомах 28, 156, 174, 228, 439, 448
 — в системе протеолипосомы — коллоидная пленка 33
 — генерация ΔpH 45, 165—175
 — двумерные кристаллы 157
 — замена аминокислотных остатков 171—173
 — ингибирование La^{3+} 170
 — и латеральный перенос ΔpH 335
 — квантовый выход 173
 — конформационные изменения 175
 — потребность в катионах 172
 — принцип функционирования 152—154
 — расщепление протепинами 25, 154, 173
 — сдвиг pK Шиффова основания 167

- синтез гена 448
 — темновая адаптация 174, 175
 — тирозины, необходимые для активности 173
 — трехмерная структура 154—157, 548
 — фотоцикл 162—165
 — электрогенные стадии 165—173
 Бактериоруберин 162
 БАЛ — см. Британский антилейкоцит
 БАЛ-чувствительный фактор — см. Негемовый железосерный белок в CoQH_2 -цитохром *c*-редуктазе
 Бактериофаг
 — и белок оболочки 281—284
 — транспорт ДНК 285
 Бактериофеофитин 35, 53, 61, 67, 68
 Бактериохлорофилл 35, 53, 61, 67, 68, 74, 75, 81
 — *a* 48, 81, 82
 — димер 35, 61, 67, 68, 72, 77
 — фотоокисление кислородом 68
 Барбитураты 103
Bacillus
 — *alcalophilus* 319, 392, 403
 — *brevis* 289
 — *firmus* 393, 403, 413
 — *subtilis* 286, 290, 403
 — YN-1, алкалофильная 393, 413
Bdellovibrio bacteriovorus 270, 291
 Белок
 — закрепление в мембране 24—26
 — ингибитор F_1 215, 216, 226, 235
 — киназы 183, 184, 310, 333
 — латеральное движение в мембранах 26, 366, 369
 — процессинг 272—279
 — транспорт через мембрану
 — — бактерий 282—285
 — — митохондрий 271—285
 — — хлоропластов 285
 Белок G 183
 Белок Риска — см. Негемовый железосерный белок в CoQH_2 -цитохром *c*-редуктазе
 Белок, связывающий
 — валин 280
 — изолейцин 280
 — лейцин 280
 — мальтозу 280
 Белок, сообщающий чувствительность к олигомицину 209—218, 221
 Бензимидазол 426, 435
 Бензойная кислота 44
 Бислойная мембрана — см. Мембрана, плоский бислой
 Биотин 379, 380
 Биоэнергетика
 — биотехнологические аспекты 431, 432
 — история развития 433—448
 — определение 7
 — отношение к другим биологическим наукам 6
 — раковой клетки 426—429
 — эволюционные аспекты 18, 405—409
 Бифитонилглицерин 23
Blastocladiella emersonii 338
 Болезнь Хантингтона 425
 Бонгкрековая кислота 266—269, 302—306
 Британский антилейкоцит 120
 Бурый жир 304, 307—313, 325
 Бутанол 232
 Буферы ΔpH 79, 95, 96
 Валиномицин 36, 40, 71, 195, 249, 266, 283, 350, 373, 389, 396, 435, 436, 438, 448
 Ванадат 195—199, 201, 203, 419
Veillonella alcalensis 380, 413, 431
Vibrio
 — *alginolyticus*
 — — АТР-синтаза, Na^+ 400, 401
 — — H^+ -энергетика 413
 — — Na^+ -сопряженное окислительное фосфорилирование 399—401, 414
 — — Na^+ -цикл 402, 403, 407, 415, 416
 — — Na^+ -зависимая дыхательная цепь 381—385, 416
 — — Na^+ -мотор 287, 288, 392, 393, 416
 — — Na^+ , метаболит-симпортеры 388
 — *cholerae* 287, 393, 430
 — *costicola* 381—385, 388, 416
 — *harveyi* 372, 393
 — *parahaemolyticus* 296, 393, 429
 — *succinogenes* — см. *Wolinella succinogenes*
 Викасол 323, 423
Victoria 315
 Витамин A 188
 Витамин K_1 86
 Витамин K_3 — см. Менадион
 Внешняя клеточная мембрана — см. Плазмалемма
 Водорода, ион
 — как вторичный посредник 409—412
 — как сопрягающий ион — см. Сопрягающий ион
Wolinella succinogenes 144, 209
 Высокоэнергетическое соединение, определение 16

- Галактоза 21
Haemophilus influenzae 285
 β-Галактозидаза 278
Halobacterium halobium 152, 153, 160, 173—177, 182, 183, 190, 333, 335, 372, 389, 419
 Галородопсин 13, 175—177, 406, 419, 448
 Галотан 241
 Галотолерантная бактерия *Ba*₁ 383, 384, 416
 Галофилы 152, 153, 160, 179, 406—408
 Ганглиозид 22
 Гексааминопутений 121
 Гексокиназа 23, 241, 330
 Гем *b_h* 49, 50, 76, 93, 99, 110, 110, 120
 — *b_i* 49, 50, 76, 77, 93, 99, 110, 120, 121
 — хлорированный 138
 Гемин 428
 Гемоглобин 366
 Генератор ΔpH
 — внутреннее сопротивление 174, 175
 — вторичный 191
 — первичный 45, 188—190
 — соотношение переноса H⁺ и e⁻ 191
 Гентамицин 429
 Гептан-1, 2, 3-триол 53
 2-Гептил-4-оксихинолин-N-оксид (HQNO) 94, 120, 315, 381—385, 399
 Гербицид 55, 89
 Гидрогеназа 144
 Гидрогенпероксидаза 327
 Гидроксамат-α, α'-бипиридин 315
 Гидроксилламин 149, 195—197, 203
 Гидрофобные ионы — см. Липофильные ионы
 Гипергликемия 428
 Гипернефрома 429
 Гипертироидное состояние 344, 425
 Гипоксия 344, 352, 378, 425
 Гипотироидное состояние 331
 Гипофиз 202
 Гистон 285
 Гликоген 315
 Гликолиз 145, 193, 206, 255, 303, 304, 310—312, 375, 413, 426
 Гликолипидсульфат 162
 Гликолипиды 21
 Глицерин 311, 315, 411
 Глицериннонитол 23
 Глицерин-3-фосфат 144, 321
 — дегидрогеназа 322, 326, 327
 Глюкоза
 — в ганглиозиде 21
 — как гликолитический субстрат 144, 314
 — транспорт в *E. coli* 248
 — фотосинтез 229
 Глюкозо-6-фосфат 419
 — дегидрогеназа 240
 Глютаконил-CoA 380
 Глютамат/аспартат-антипортер 270, 327
 Глютаматдегидрогеназа 273
 γ-Глютаминаминобутирилглицин 373
 Глютамин 101, 369, 374
 — синтаза 374
 Гормоны, механизм действия 183, 184
 Градиент концентрации ионов Na⁺ — см. ΔpNa
 Грамицидин D 238, 261, 304, 383, 429
 Гуанилатциклаза 411, 412
 Гуанозин-5'-дифосфат (GDP) 16, 101, 183, 184, 269
 Гуанозин-5'-монофосфат (GMP) 16, 183
 Гуанозин-5'-трифосфат (GTP) 16, 101, 183, 184, 269, 412
 Гуанозин-3', 5'-циклический монофосфат (сGMP) 179—187, 333, 412
 Движение
 — бактерий 287—299
 — простейших 287
 — сперматозоидов 287
 Девесковинида 298, 299
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)
 — биосинтез
 — регуляция изменением pH 412, 426—428
 — роль K⁺ 426
 — митохондриальная 104, 111, 114, 125, 279
 — транспорт через бактериальные мембраны 285, 286, 448
 — ядерная 125, 279
 Декарбоксилаза
 — глютаконил-CoA 379, 416
 — α-кетоглутарата 13
 — метилмалонил-CoA 379, 416
 — Na⁺-зависимая 379—381, 416, 448
 — оксалоацетата 379—381, 388, 416
 Дельтаэндотоксин 418
 Диазафлавин 145
 n-Диазобензосульфат 271
 ДТ-диафороаза 323
 Диафрагма (мышца) 340—342

- Диацилглицерин 183, 329, 361, 362, 365, 409—411, 426
 N,N-Дибензил-N,N-диметиламмоний 37
 Дибромтимохинон 94
 Дибутрил-сАМР 312
 Дигидрофитол 162
 Дигидрофлатредуктаза 278
Dictiostellum discoideum 199
 Дикумарол 323, 435
 N,N-Диметилдодециламин-N-оксид 53
 Диметилсульфоксид 224
 2,4-n-Динитрофенол 296, 306, 435, 448
 Дио-9 242
 1,3-Дифосфоглицерат 101
 3-(3,4-Дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (диурон) 87, 94, 351
 N,N-Дициклогексилкарбодимид (ДЦКД), эффект на
 — вращение хлоропласта 296
 — Ca²⁺—АТФазу 400
 — H⁺—АТФазу
 — в плазмалемме растений и грибов 197
 — в тонопласте 199, 200
 — в хромаффинной грануле 201—203
 — у *Lactobacillus casei* 195
 — H₂PO₄⁻, H⁺-симпортер 270
 — H⁺-пирофосфат-синтазу 242
 — K⁺/H⁺-антипортер 328
 — Na⁺—АТФазу 394, 400
 — Na⁺—АТФ-синтазу 400, 401
 — Na⁺/K⁺—АТФазу 386
 — синтез АТФ при метаногенезе 395
 — термогенин 307
 — трансгидрогеназу 246
 — фактор F₀ 207, 222, 227, 236
 — фактор F₁ 207, 208, 222
 — фототаксис *Halobacterium halobium* 177, 178
 — цитохром *b* 120
 — цитохромоксидазу 136, 137
 Диэтилстилбэстрол 197, 198, 203, 221, 396—402, 490
 Доксорубин — см. Адриамицин
 Дыхательная цепь
 — в фотосинтетических бактериях 141
 — источники восстановительных эквивалентов 100
 — митохондриальная 99, 141
 — Na⁺-зависимая 381—385, 448
 — несопряженная — см. Свободное дыхание
 — определение 97
 — превращение энергии 97
 — схема трех циклов 139—141
 — у гетеротрофных аэробных бактерий 141
 Дыхательное фосфорилирование 97, 104, 268, 269, 448
 Дыхательный контроль — см. Протонный контроль
 Железа двухвалентного ион, как донор электронов 147, 148, 248
 Жирные кислоты
 — дикарбоновые 424
 — десатурация 365
 — десорбция гексокиназы с митохондрией 330
 — как терморегуляторные разобщители 303, 313, 316, 317, 329
 — ковалентное связывание с белком 25, 53
 — β-окисление 102, 258, 259, 306, 312
 — структура 19, 20
 — транспорт 256—260
 — элонгация 363
 Жирный ацилкарнитин 258—261, 362
 Жирный ацил-CoA 256—261, 269, 305, 329, 362
 — дегидрогеназа 273
 — синтаза 261
 Зеленые фотосинтезирующие бактерии
 — анаэробные 52
 — аэробные 52
 Зимняя спячка 312
 Изопропилмалатсинтаза 273
 Изокитратдегидрогеназа 411
 Имиодифосфат 242
 Инозиттрифосфат 183, 329, 411
 Инсулин 202, 389, 412
 Иодопсин 186
 Калоригены 316, 317
Caldariella acidophila 23
 Кальмодулин 183, 411
 Кальция, ион
 — аккумуляция в митохондриях 249, 255, 328, 329, 361
 — активация Na⁺—АТФазы 387
 — активация протеинкиназы C 411
 — активация фосфолипазы A₂ 330
 — активация фоторедокс-цепи 384
 — в фоторецепции 183, 184
 — в фототаксисе цианобактерий 42
 — выброс из митохондрий 253, 361
 — ингибирование бактериородопсина 170

- как вторичный посредник 183, 329, 411
- транспорт по гигантским митохондриям 362
- Campylobacter foetus* 289
- Канал
 - кальцевый 183
 - натриевый 183, 522
- Candida albicans* 351
- Канцероген 428
- Канцерогенез, роль антипортера Na^+/H^+ 426
- Карбоамилфосфатсинтаза 273
- Карбоксиатрактолизид 266—270, 302—307
- Кардиолипиды 21, 25, 124, 270, 425
- Кардиомиопатия 424
- Карнитин 256—260, 311, 363
- Карнитинацетилтрансфераза 273
- Карнитин жирный ацилкарнитин-антипортер 258, 259
- Карнозин 206, 375—378
- Каротиноидный сдвиг, электрохромный — см. Измерение электрической разности потенциалов
- Каротиноиды 35, 70, 162
- Каталаза 326
- Катехоламины H^+ -антипортер 257
- Катехоламины 411
- 3-Кетоацетил- CoA -тиолаза 273
- α -Кетоглютарат 100, 101, 269, 425
- дегидрогеназа 101, 424
- Кинезин 298
- Кислород, редокс-потенциал 101
- Кластер FeS — см. Негемовый железосерный белок
- Klebsiella*
 - *aerogenes* 380, 381, 415—417
 - *pneumoniae* 380, 389, 416
- Клеточный цикл 333
- Clostridium*
 - *pasteurianum* 209
 - *symbiosum* 380, 413
 - *thermoaceticum* 209
- Колицин 430
- Colocasia odora* 84, 315
- Комплекс I — см. $\text{NADH}-\text{CoQ}$ -редуктаза
- Комплекс II — см. Сукцинатдегидрогеназа
- Комплекс III — см. CoQH_2 -цитохром c -редуктаза
- Комплекс IV — см. Цитохромоксидоза
- Комплекс b_c — см. CoQH_2 -цитохром c -редуктаза
- Комплекс b_{af} — см. PQH_2 -пластоцианин-редуктаза
- Комплекс фотосинтетических реакционных центров (бактериальный)
 - аминокислотная последовательность 55—60
 - в протеолипосомах 72, 123
 - в системе протеолипосомы—коллоидная пленка 33, 72
 - генерация ΔpH 71—75
 - кристаллизация 53
 - определение 51
 - последовательность переноса электронов 67—71
 - субъединичный состав 51—55
 - трехмерная структура 53—55, 448
- Компьютер молекулярный 369
- Коньюгация бактерий 285, 286
- Кортизол 320
- Коэнзим A(CoA) 101, 256—261, 362
- Коэнзим Q (CoQ) 48
 - в бактериальной CoQH_2 — цитохром c -редуктазе 75—77
 - в дыхательной цепи 97, 119—121, 142, 148
 - в комплексе бактериальных фотосинтетических реакционных центров 35, 61—65, 70—76
 - в регуляции лактоза- H^+ -симпортера 263—265
 - редокс-потенциал 101
- Коэнзим M 145
 - редуктаза 145
- CoQH_2 —цитохром c -редуктаза
 - в бактериальной фоторедокс-цепи 75—77, 192
 - в дыхательной цепи 110—123
 - в протеолипосомах 110, 122
 - в эмбриогенезе 428
 - дефицит у человека 423
 - концентрация в митохондриальной мембране 240
 - CoQ -связывающая субъединица 110, 111
 - обращение 248
 - процессинг субъединиц 272
 - расположение в мембране 240
 - редокс-центры 114—116
 - сердцевинные белки 111
 - соотношение H^+/e^- 100
 - субъединица, связывающая FeS_{III} 120
 - субъединица, связывающая цитохром c 111
 - субъединичный состав 110, 111, 119
 - у *P. denitrificans* 119
 - у *Thiobacillus ferrooxidans* 147
- Ксенобиотики, окисление 321
- Креатинфосфат 17, 375, 423

- киназа 17, 25
- Cryptophyceae* 338
- Кротонил- CoA 381
- K^+ -транспортирующая система A (TrKA) 250, 370, 373
- β -Лактамаза 280
- Лактат 100, 101, 144, 255, 263—265, 319, 320, 374, 379, 399
 - дегидрогеназа 273, 320
- Лактат, H^+ -симпортер 255
- Lactobacillus casei* 195, 197, 199, 207
- Лактоза, H^+ -симпортер 254
- Лантана ион, ингибирование бактериородопсина 170
- Leishmania donovani* 338
- Лейкоцит, вспышка свободного дыхания 319
- Лидер-пептидаза 272—280
- Лизосома 10, 194, 202, 206
- Лизофосфолипиды 330
- Limonium vulgaris* 419
- Липаза 312
- Липоат 101
- Липолиз 306
- Липопокс 381
- Липолисахаридов транспорт 284
- Липопротейды 26
- Липосома 25, 28, 436
- Липофильные ионы 37, 71, 428, 436
- Липохондрия 188
- Локальная $\Delta\psi$ 237—241
 - локальная ΔpH 237—241
 - локальная ΔpH 237—241
- Малат 101, 144
- Малат-аспартат-глутаматный челнок 325, 327
- Малатдегидрогеназа 273, 326, 327
- Малат²⁻/цитрат³⁻, H^+ -антипортер 255
- Магния ион
 - регуляция K^+/H^+ -антипорта 328
 - унос в хлоропластах 329
- Медь 124—132, 135—136
- Мелибиоза 388
- Мелитин 281
- Мембрана
 - внешняя клеток эукариот — см. Плазмалемма
 - граница раздела как проводник H^+ 355, 356, 361
 - классификация 8—10
 - определение 8
 - плоский бислой 19, 21, 29, 31, 37, 38, 435, 437
- Менадион 323, 423—425
- Менахинон (MQ) 48, 61, 64, 68, 72, 144, 381
- 2-Меркаптоэтансульфонат — см. Коэнзим M
- Мерсалил 320, 367
- Метан 145, 146
- Methanobacterium thermoautotrophicum* 251, 396, 416
- Метаболизм 145, 146, 396, 432
- Methanococcus voltae* 396, 397, 416
- Метгемоглобин 101, 366
- Метиламин 44
- Метилмалонил- CoA 380, 381, 394
 - мутаза 273
- Метилпродамин (родамин 123) 328, 347, 350, 428
- 1-Метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропирин 428
- Метилэллиптициновый 429
- Миелопероксидаза 321
- Mycobacterium phlei* 320, 388
- Mycoplasma* 295, 386, 400
 - *mycoides* 386
- Микостерол 22
- Micromonas* 338
- Микросома — см. Эндоплазматический ретикулум
- Микротрубочки 351, 361
- Микрохемосмотическая гипотеза — см. Локальная ΔpH
- Миксотиназол 120
- Mixotricha paradoxa* 298—300
- Миопатия 423—425
- Митохондриальный ретикулум 338—347, 363—365, 367, 375
- Митохондрия
 - биогенез 272—280
 - внешняя мембрана 9
 - внутренняя мембрана 9
 - гигантская 338—353
 - движение 298
 - забуферивание ΔpH 375
 - измерение $\Delta\psi$
 - — микроэлектродом 35
 - — синтетическими проникающими ионами 39
 - контакт 340, 342, 344, 345, 347, 355
 - латеральный транспорт
 - — ΔpH 353—361
 - — жирных кислот 362—365
 - — Ca^{2+} 361, 362
 - — кислорода 362—365
 - локальная ΔpH 237—241
 - набухание при мышечной работе 323
 - питчатая 337, 347—352, 360, 365—369
 - окраска родамином 41—42, 353—355
 - слияние мембран 275, 276, 283
 - содержание фосфолипидов 365
 - транспорт Ca^{2+} 361

- форма 337
Молибден 143
Моненсин 261, 380, 381, 393, 394—399, 400—402, 431
Моноаминоксидаза 273
Мотор H^+ 12, 78, 235, 287—298, 413, 448
Мочевина цикл 319, 324
Муреин 26
Муцидин 120
- Надпочечник 201
 Na^+ , аспартат-симпортер 388, 389
 Na^+ —АТРаза — см. АТРаза, Na^+
 Na^+/H^+ -антипортер 255, 269, 371, 382, 383, 385, 390, 409—412, 416
 $Na^+(H^+)$ -мелибиоза-симпортер 388, 389
 Na^+ , H^+ , цитрат-симпортер 388, 389
 Na^+ , глюкоза-симпортер 389
 Na^+ -движущая сила (Δs) 14
 Na^+ -декарбоксилаза — см. Декарбоксилаза, Na^+ -зависимая
 Na^+/K^+ -градиент как буфер ΔpH 14, 78, 370—374, 405—408, 448
 Na^+ -контроль 27
 Na^+ , метаболит-симпортеры 388, 399—401, 406, 413—417, 426
 Na^+ -мотор 287, 288, 393, 399, 402, 448
 Na^+ —NADH-мена(уби)хинонредуктаза 381—385, 402
 Na^+ , пролин-симпортер 388, 405—408
 Na^+ -цикл 402—405, 413—417, 431
NAD — см. Никотинамидадениндинуклеотид
NADH-адреноредоксинредуктаза 321
NADH-дегидрогеназа 101, 144, 318, 369, 381, 428
NADH—CoQ-редуктаза
— бактериальная 105, 110, 122, 150
— в митохондриях 99, 106
— в протеолипосомах 104
— в раковых клетках, ингибирование 428
— в хромосомах 78, 122
— генерация ΔpH 104—109, 192
— гены 104
— дефицит у человека 423
— концентрация в митохондриальной мембране 140
— обращение 248
— отношение H^+/e^- 97—100, 104, 109, 110, 118
— перенос электронов 104, 105
— расположение в мембране 98, 99
— редокс-центры 97, 102, 103, 108
— состав субъединиц 102, 103
— у *Thiobacillus ferrooxidans* 148
NADH-цитохром b_5 -редуктаза (Фл₅) 25, 313, 321, 365—368
NADP — см. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
NADPH-цитохром P-450-редуктаза 321
Natronobacterium 179
Natronococcus 179
Невропатия 424
Негемовое железо
— в комплексе реакционных центров 61, 66, 71
— в фотосистеме II 88
Негемовые железосерные белки
— в CoQH₂-цитохром *c*-редуктазе 49, 76, 77, 99, 111, 115, 121
— в NADH—CoQ-редуктазе 99, 102—110
— в нециклической фоторедокс-цепи зеленых бактерий 82
— в PQH₂-пластоцианинредуктазе 90—95
— в форматдегидрогеназе 143, 144
— в фотосистеме I 86, 87
— в фумаратредуктазе 144
— самоокисляющиеся 385, 386
Neurospora 103, 198, 272, 278
Нигериция 261, 266, 328, 399, 426
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 77—79, 100, 101, 243—248, 365, 366
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) 77—79, 83—85, 95, 102, 103, 243—248
Нистатин 298
Nitella 351
Nitellopsis obtusa 198
Нитрат 199, 203
— как окислитель редокс-цепи 142
— редокс-потенциал 101
— редуктаза 142
Нитрит 142, 148
Nitrobacter 125, 148, 180
Nitrosomonas europaea 149, 180
n-Нитрофенол 44
Норадреналин 201, 302, 307, 310—313
Нуклеозиддифосфаткиназа 269
- Обратный перенос электронов 13, 77, 147, 148, 247, 248, 448
Ожирение 313
Олигомицин 199, 200, 203, 221, 227, 386
Окаймленные гранулы 201
Околоушная железа 201
Оксалоацетат 101, 144, 379, 380, 388
Окспацитил-CoA-дегидрогеназа 273
 β -Оксибутиратдегидрогеназа 101, 273

- Оксидаза D-аминокислот 326
Оксинафтохинон 430
Оксихинолин 317
Октадециламин 29
Онкобелки 426
Опухолевая клетка
— регуляция pH 203
— Эрлиха — см. Асцитная карцинома Эрлиха
Орнитинаминотрансфераза 278
Орнитинтранскарбамилаза 278, 279
Осморегуляция 252
Осмотическая работа, определение 248
Oscillatoria brevis 351, 384
Отношение P/O 149—152
Оуабайн 386, 387, 419
- Пальмитоилкарнитин 258, 425
Paracoccus denitrificans 110, 119, 124, 142, 189
Паркинсонизм 428
Пастера эффект 301, 423
Пентахлорфенол 435
Peptococcus aerogenes 380, 413
Peptostreptococcus asaccharolyticus 413
Пероксисома 10, 326
Пикрат 37
Rutaimonas gelidicola 417
Пиридин 44
Пирицидин 101
Пирофосфат, неорганический (PP_i) 17, 242, 269, 374
Пирофосфатаза, мембранно-связанная — см. Пирофосфат-синтаза, H^+
Пирофосфат-синтаза, H^+ 33, 77, 78, 242—244, 374, 448
Пируват 101, 144, 388, 423
— дегидрогеназа 101, 389
 ΔpK 370—374, 386, 394, 417—419
Плазматесма 336
Плазмалемма 194, 197, 198, 199, 374, 411, 413
Плазмалоген 21
Plasmodium
— *lophurae* 429
— *vivax* 429
Пластохинон 48, 83—86, 88, 95, 332, 384
Пластоцианин 83—87, 94, 122
Платанетин 318
Pleurochristis carterae 338
Плотный контакт 345
PQH₂-пластоцианинредуктаза 83—86, 90—95, 122
 ΔpNa 255, 370—374, 386, 388, 390, 399
- Поглощение и освобождение H^+ , быстрое измерение 43—45
Поджелудочная железа 202
Polytoma papillatum 338
Polytomella agilis 339
Потребление этанола, хронический эффект на митохондриях 425
Prasinophyceae 339
Pyrenesiophyceae 339
Промитохондрии 279
Проникающие ионы, синтетические — см. Липофильные ионы
Пропанол 313
Propionigenium modestum 379, 386, 394—396, 400—402, 404, 416
Пропионат 144, 380, 394, 395
Пропионил-CoA 380
— карбоксилаза 273
Простагландины 411
Протеинфосфатазы 333
Протеолидин 211
Протеолипосома
— ассоциация с коллоидной пленкой 29—34
— метод реконструкции 28
— определение 28
Протометр 177, 178, 186, 287, 332
Протондвижущая сила (Δp) 14
Протонный контроль 27, 104, 150, 223, 242, 285, 301, 426
Протонный цикл — см. Хемисмотическая теория
Протонофор 134, 148, 195, 292, 293, 301—303, 331, 332, 353, 379—385, 388, 393—399, 405, 409, 434, 435
Pseudomonas 291
— *aeruginosa* 389
— *stutzeri* 384, 390, 399
Пурпурные фотосинтезирующие бактерии 34, 52, 79, 82, 88
- Разность pH (ΔpH) 14, 15, 43—45, 95, 96, 328, 370, 374, 389, 390, 393, 402, 436
Разность электрических потенциалов ($\Delta \Psi$)
— в распределении мембранных белков 55
— в тилакоиде 96
— измерение 27—42
— в отдельной клетке 41
— в системе «мембранные пузырьки — мембранный фильтр» 35
— в системе «протеолипосома — коллоидная пленка», 33, 40, 71
— методом «пэча» 36
— микроэлектродами 34, 36, 199
— по каротиноидному сдвигу 42, 43, 71, 88

- по распределению природных ионов 36
- синтетическими проникающими ионами 37—41
- определение 9
- открытие в сопрягающих мембранах 436
- превращение в ΔpH 328, 370, 374, 390
- Разность электрохимических потенциалов
 - ионов H^+
 - забуферивание 370—374, 378
 - как конвертируемая энергетическая валюта 12, 13, 417
 - определение 12, 13
 - открытие 433—437
 - перенос 334, 335, 353—364
 - у бактерий, как функция $pH_{\text{наруж}}$ 402—404
 - ионов Na^+ ($\Delta \mu Na$) 11, 12, 14, 145, 248, 379, 381, 390, 394—399, 405—409, 413—419
- Ранний рецепторный потенциал сетчатки 185—187
- Разобщение, терморегуляторное
 - в буром жире 307—313
 - в мышцах 301—307
 - в растениях 315—318
- Разобщитель — см. Протонофор
- Регуляция pH в цитоплазме 195, 198, 199, 205, 390—393, 402—406, 411, 412
- Рейн 102
- Редокс-петля 104, 134, 139—142, 405, 406
- Репелленты 290—292, 333, 334
- Редокс-цепь
 - в анаэробных бактериях 142—147, 188—189
 - дыхательная — см. Дыхательная цепь
 - фотосинтетическая — см. Фоторедокс-цепь
- Ретиналь 152—160, 165—167, 174—188
- Reticulum mitochondriale — см. Митохондриальный ретикулум
- Рибонуклеаза 285
- Рибонуклеиновая кислота (РНК)
 - активация АТРаза 287
 - в сигнализующих частицах 285
 - информационная 287, 331
 - полимераза 273
 - рибосомальная (5S) 406
- Rhizobium 143, 199
- Rickettsia prowazekii 270
- Родамин 41, 42, 350—351, 428
- Родамин 123 — см. Метилродамин
- Rhodospseudomonas
 - capsulata 138, 431
 - sphaeroides 47, 51, 70, 76, 122, 124, 138, 189
 - viridis 47, 51, 53, 55, 61—74, 77, 189
- Родопсин
 - зрительный
 - аминокислотная последовательность 180
 - в радужной оболочке 188
 - в системе протеолипосомы — коллоидный фильтр 33, 186, 187
 - генерация $\Delta \Psi$ 186, 187
 - каскад cGMP 183, 185
 - расположение в мембране 179
 - роль Ca^{2+} 183, 186
 - синтез гена 448
 - у Chlamidomonas 188
 - фотоцикл 183
 - сенсорный — см. Сенсорный родопсин
- Rhodospirillum rubrum 47, 49, 51, 52, 124, 142, 189, 221, 222, 227, 242, 247, 290, 374, 413
- Родохинон 145
- Ростовые факторы 426
- Ротенон 103, 109, 142, 152, 313, 315, 320, 351, 423
- Салициловая кислота 44, 435
- Salmonella typhimurium 291, 379, 388, 404, 416
- Саркоплазматический ретикулум 411
- Sauromatum guttatum 315
- Сафранин О 350
- Сахароза/ H^+ -антипортер 254
- Свободное дыхание 95, 302, 322, 325—328
- Секреторные пузырьки (гранулы) 194, 201, 413
- Сенсорный родопсин галобактерий 177, 178, 333
- Серебра ион, ингибирование дыхательной цепи 381
- Серотонин 202
- Сигнализующие частицы 285
- Симбиоты эукариот и прокариот — движение 298—300
- Symplocarpus foetidus 315, 316
- Симпортер Cl^- , H^+ 175, 176
- Симпортер $H_2PO_4^-$, H^+ 149, 229, 253, 255, 270—271, 328
- Симпортер K^+ , H^+ 251, 373
- Симпортеры H^+ , метаболит 78, 193, 194, 197, 254, 255, 390

- Синаптические пузырьки 202
- Синдром Рейе 425
- Синдром Фалькони 425
- Synechococcus 296, 297
- leopoliensis 384
- Система комплемента 429
- Система расщепления воды хлоропластов и цианобактерий 83, 85, 89
- Слизистая желудка 203, 204
- АТРаза — см. АТРаза, H^+/K^+
- Сквален 160
- Соотношение H^+/e^-
 - в бактериальной циклической фоторедокс-цепи 122
 - в дыхательной цепи 152
 - в $NADH-CoQ$ -редуктазе 104, 105, 109, 110, 142
 - в нециклической фоторедокс-цепи хлоропластов 86
- Соотношение H^+/O 97
- в дыхательной цепи E.coli 190
- в митохондриальной дыхательной цепи 139, 151
- Соотношение H^+/ATP 150, 151, 229, 233, 235
- Сопрягающий ион 10, 11, 406—408, 413—415
- Сперматид 344
- Сперматозоид 344
- Специальная пара бактериохлорофилла — см. Бактериохлорофилльный димер
- Spirillum volutans 289
- Спирохета 298
- Спироплазма 296
- Spirulina 432
- Staphylococcus aureus 271
- Стероидные гормоны 331, 365
- Стероиды 22, 365
- Streptococcus 290
 - cremoris 255
 - faecalis 197, 207, 228, 255, 394, 403, 416
 - pneumoniae 429
- Стрептомицин 429
- Субклеточные бактериальные пузырьки 28, 29, 195
- Субмитохондриальные пузырьки 34, 35, 104
- Substantia nigra 429
- Сукцинат 101, 143, 144, 150, 151, 253, 394, 409
 - дегидрогеназа 97, 98
- Сукцинил-CoA 394
- Сульфит 221, 230
- оксидаза 273
- Сульфопириды 160
- Супероксид
 - дисмутаза 273
 - радикал 321
- Сфинголипиды 21
- Сфингомиелин 21
- Таксис, бактериальный 291, 292, 333
- Tenebrio molitor 256
- Thermus thermophilus 125
- Термоацидофил 23
- Термогенез сократительный 306, 322, 323
- Термогенин 305—311, 441
- Терморегуляторная функция ΔpH — см. Разобщение терморегуляторное
- Термофилы 15, 160, 431, 432
- Термофильная бактерия PS3 124, 138
- Тетрабутиламмоний 38
- Тетраметил-*n*-фенилендиамин 382
- Тетрафенилборат 37, 38
- Тетрафенилфосфоний 37, 38, 382
- Тетрациклин 428, 429
- Тиамин 41
- Тилакоид 83, 95, 96, 375
- Thiobacillus
 - A2 148
 - ferrooxidans 138, 147, 190, 248
 - novellus 138
- Тиосульфат 148
- Тиоцианат 317
- Тиронидные гормоны 313, 326, 331
- Тироксин — см. Тиронидные гормоны
- Тонопласт 194, 199, 200, 243, 413
- Torpedo marmorata 202
- Трансгидрогеназа 13
 - в митохондриях 101, 243—244
 - в протеолипосомах 244
 - в системе протеолипосомы — мембранный фильтр 33
 - в хроматофорах 77, 243
 - метаболическая функция 246
 - механизм 244—245
 - определение 243
 - упаковка в мембране 246
 - энергетика 243
- Трансдуцин 183, 187, 188
- Трансформация, генетическая 285
- Трийодотиронин — см. Тиронидные гормоны
- Триметилолово 197
- Трупазома 338
- Трифосфоинозит — см. Инозиттрифосфат
- TgKA — см. K^+ -транспортирующая система A
- Тромбин 412, 429

Убихинон — см. Коэнзим Q
 Умбеллиферон 44
 5-*n*-Ундецил-6-окси-2,7-диоксибен-
 зотиазол 120
 Унипорт K⁺
 — в бактериях 389
 — в митохондриях 328
 — в хлоропластах 328
 Уратоксидаза 327
 Фаг — см. Бактериофаг
 F₄₂₀ — см. Диазафлавин
 Фактор В — см. Фактор F₂
 Фактор окисления (фактор Слей-
 тера) — см. Негемовый железосер-
 ный белок в CoQH₂-цитохром с-
 редуктазе
 Фактор F₀ 24, 28, 193
 — аминокислотная последователь-
 ность 210
 — ген 208
 — определение 207
 — проводимость для H⁺ 225—227,
 295, 372
 — процессинг субъединиц 272, 278
 — расположение в мембране 218—221
 — состав субъединиц 207—218
 — эффект ДЦКД 227
 Фактор F₁ 23, 28, 193
 — аминокислотная последователь-
 ность 210
 — ген 208
 — гидролиз АТР 221—224
 — ингибирование АТР 231
 — каталитический центр 230, 231
 — односторонний гидролиз АТР
 219, 220
 — определение 207
 — отделение от мембраны 218
 — процессинг субъединиц 278
 — связывание нуклеотидов 220—221,
 230—237
 — синтез связанного АТР 224—225,
 441
 — состав субъединиц 207—218
 — трехмерная структура 218
 — эффект ДЦКД 227, 237
 Фактор F₂ 245
 Фактор F₆ 245
 Фактор T_u 281
 Феназинметосульфат 88, 138
 o-Фенантролин 72, 89
 Фенилгидразон 435
 Фенилдикарбаундекаборан 37
 4-Фенил-N-метилпиридин 428
 Феофитин 89
 Ферредоксин 85, 86, 87
 Ферредоксин-NADP⁺-редуктаза 86,
 87

Ферроцианид 134
 Philodendron selloum 315, 317
 Фитостерол 22
 Флавинадениндинуклеотид 81, 87,
 142, 381
 Флавиномонуклеотид 104—110, 139,
 142, 381
 Флавиновый цикл 104, 139—141
 Флагелла
 — бактериальная 287—290
 — эукариотическая 287
 Флагеллин 287, 393, 413
 Flexibacter 296
 Фобородопсин 177, 178, 333
 Формальдегид 146
 Формиат 144, 388
 — дегидрогеназа 144
 Phormidium uncinatum 295, 296,
 336, 351, 372
 Фосфатаза, щелочная 284
 Фосфатидилглицерин 21, 160
 Фосфатидилглицерофосфат 160
 Фосфатидилинозит 21
 Фосфатидилинозит-5,6-дифосфат 21,
 183, 365
 Фосфатидилсерин 21
 Фосфатидилхолин 21—23
 Фосфатидилэтанолламин 19—22
 Фосфат неорганический
 — переносчик в митохондриях —
 см. Симпортер-H₂PO₄, H⁺
 Фосфат/3-фосфоглицерат-антипортер
 271
 Фосфатидная кислота 21
 3-Фосфоглицеральдегид 100, 101
 2-Фосфоглицерат 17
 Фосфодиэстераза
 — специфичная к фосфатидилино-
 зитдифосфату 409—411
 — специфичная к cGMP 183
 Фосфолипаза 330, 425
 Фосфорилирование
 — дыхательное — см. АТР-синтаза, H⁺
 — субстратное 13, 102, 147, 312,
 395, 413
 Фосфонополирует 17, 248
 — трансфераза 419
 Фотолиз воды — см. Система расщеп-
 ления воды
 Фоторецептор
 — диск 33, 186
 — клетка 183—186
 Фоторедкс-цепь
 — нециклическая
 — — в зеленых бактериях 79—82,
 188, 189
 — — в хлоропластах и цианобак-
 териях 82—96, 122, 189

— циклическая
 — — в пурпурных бактериях
 34—50, 189
 — — в хлоропластах и цианобак-
 териях 83, 123
 Фотосистема I 83, 86—88, 122
 Фотосистема II 83, 88—90, 122, 384
 — активация Na⁺(Ca²⁺) 384
 — в тилакоиде 239
 — гомология с бактериальным реак-
 ционным центром 52, 90
 — донор электронов Z 89
 — и латеральный транспорт ΔpH
 335
 — механизм генерации ΔpH 90
 — механизм переноса электронов 89
 — регуляция 331—333
 — субъединичный состав 86, 87
 Фотосистема II 83, 88—90, 122, 384
 — активация Na⁺(Ca²⁺) 384
 — в тилакоиде 239
 — гомология с бактериальным реак-
 ционным центром 52, 90
 — донор электронов Z 89
 — и латеральный транспорт ΔpH
 335
 — механизм генерации ΔpH 90
 — механизм переноса электронов 89
 — регуляция 331—333
 — субъединичный состав 88
 — тетрафенилбор как донор элект-
 ронов 41
 Фототаксис 42
 Фотопосфорилирование 78, 88, 95,
 96, 229, 239, 431, 433, 440
 Friedmannia 338
 Фторид 242, 399
 Fusobacterium nucleatum 380, 416
 Фузикокин 413
 Фукоземид 380
 Фумарат 101, 143—145
 — редуктаза 143, 144
 — у Wolinella succinogenes 143
 Фуникулосин 120
 Хармалин 398
 Нара 296
 Хемическая теория 237—240,
 259, 433—434, 448
 Хинон 328
 Chlamidomonas 188, 338
 Хлорида транспорт 11, 175—177,
 249, 250
 Chlorella 338
 Хлорная АТРаза — см. АТРаза,
 Cl⁻
 Chlorobium 79
 m-Хлорокарбонилцианидфенилгид-
 разон (ХКФ) 382, 385, 393,
 394—399
 4-Хлор-7-нитробензо-2-оксо-1,3-диа-
 зол 242

Хлоропласт
 — внешняя мембрана 10, 197,
 269—271
 — вращение 295—296
 — забуферивание ΔpH 374
 — измерение ΔΨ микроэлектрода-
 ми 34
 — искусственный синтез АТР по-
 средством ΔpH 438
 — каротиноидный сдвиг 42
 — локальная ΔpH 238
 — редокс-метр 332
 — фоторедокс-цепь 82
 — функции ΔpH 76, 439
 Хлорофилл a₆₅₀ 83
 Хлорофилл a₇₀₀ 83
 Холерный токсин 393
 Холестерин 22, 298
 Chromatium vinosum 47
 Хроматофор 33, 41, 44, 47, 71, 76—79,
 242, 246, 375, 413, 431
 Хромаффинные гранулы 201—203,
 254, 413
 Цереброзид 21
 cAMP — см. Адепозин-3',5'-цикли-
 ческий монофосфат
 cAMP-связывающий белок, мито-
 хондриальный 330
 cGMP — см. Гуанозин-3',5'-цикли-
 ческий монофосфат
 Цианид 122, 136, 177, 316, 317, 320
 Цианин 350
 Цианобактерии
 — движение 295, 296, 336
 — измерение ΔΨ
 — — посредством микроэлектродов
 35
 — — посредством роданина 42
 — латеральный перенос ΔpH 336,
 353
 — микроплазмидесмы 334, 353, 355
 — производство биомассы 432
 — протометр 332
 — фоторедокс-цепь 82, 383
 Цикл F — см. Флавиновый цикл
 Цикл Кребса 23, 100, 144, 312
 Цикл O 136, 139
 Цикл Q
 — в дыхательной цепи 97, 139
 — в хлоропластах и цианобактериях
 83, 94
 — и протометр 332
 — у P. denitrificans 119—121
 — у фотосинтетических бактерий 76
 N-Циклогексил-N-β(4-метилморфо-
 лин)-этилкарбонимид (ЦМКД) 232
 Циклоз 297
 Цинк 120, 124

Цирроз 425

Цитохалазин 297

Цитохром

- aa_3 — см. Цитохромоксидаза
- a_1 139, 140, 147
- a_2 139
- b 49, 76, 77, 82, 90, 97—99, 110, 119, 134, 143, 144, 321, 425
- b_2 273, 275, 365
- b_5 24, 314, 315, 320, 321, 365—368
- b_6 83, 90—94, 114
- b_{559} 89, 90
- d 138
- o 78, 138, 263
- определение 49
- P-450 273, 321, 365—367
- тетрагемовый, c -типа 51, 68, 74, 77
- f 50, 83, 87, 90—95, 132, 133
- c 24, 35, 50, 71, 110, 111, 120, 124, 133, 134, 139, 147, 273, 314, 320, 365, 423, 424, 438
- c_1 49, 76, 77, 83, 91, 110, 111, 118, 120, 123—124, 273, 278, 423
- c_2 49, 51, 69—72, 76—77, 124
- cd 138

Цитохромоксидаза

- аминокислотная последовательность 123
- биосинтез 123, 329—330
- в протеолипосоме 28, 123—134, 437
- в системе протеолипосомы — мембранный фильтр 33
- в цианобактериях 122
- дефицит у человека 424
- истощение по субъединице III 135, 136
- как H^+ -помпа 133, 441
- концентрация в митохондриальной мембране 363
- механизм Q-цикла — см. Цикл Q
- определение 123
- отношение заряд/электрон 134—139
- связывание цитохрома c 24, 124—133
- соотношение H^+/e^- 97, 134—136
- структура трехмерная 124—132
- субъединицы
 - биосинтез 124
 - состав 124—130
 - транспорт 272—280
- редокс-потенциал 133
- редокс-центры 97, 124, 132, 133
- у млекопитающих 124
- у *Nitrobacter agilis* 138

- у *P. denitrificans* 124, 125, 138
- у *Rhodopseudomonas sphaeroides* 138
- у термофильных бактерий 124, 138
- у *Thiobacillus A2* 148
- у *Thiobacillus ferrooxidans* 138, 148
- у *Thiobacillus novellus* 138
- упаковка в мембране 124
- эффект ДЦКД 136, 137
- Цитохромпероксидаза 273
- Цитрат 388, 389
- Цитратный цикл — см. Цикл Кребса
- Цитратсинтаза 273

Черная мембрана — см. Мембрана, плоский бислой

Щелевые контакты 345, 353

Schizocasia porteii 316, 317

Эволюционные аспекты биоэнергетики — см. Биоэнергетика,

эволюционные аспекты

Euglena gracilis 338

Электронный парамагнитный резонанс 102, 110

Электросинтез АТФ 25, 237

Eimeria tenella 429*Endomycetes magnussii* 352

Эндоплазматический ретикулум 10, 194, 195, 321, 361, 367—369

Эндосома 194, 195, 202, 206

Эноил-CoA-гидратаза 273

Entamoeba histolytica 429

Энцефаломиопатия 424

Энцефалопатия 425

N-Этилмаленимид 201, 203, 270, 320, 373

Этилродамин 336, 347—350, 428

Эфrapeптин В 222

Exiguobacterium aurantiacum 386*Escherichia coli*— АТФаза, K^+ 36, 249, 250, 417— АТФ-синтаза, H^+ 208—209— буфер ΔpH 372

— выброс тетрациклина 429

— гомеостаз внутриклеточного pH 390

— движение теней 301—306

— колиции 429

— муреиновый липопротеид 26

— NADH—CoQ-редуктаза 103, 142

— нитратредуктаза 142

— осморегуляция 251

— отношение H^+/ATP 198— отношение H^+/e^- 142— отношение H^+/O 189— пролин, Na^+ -симпортер 388, 406

— регуляция клеточного деления 334

— трансгидрогеназа 246

— транспорт растворимых веществ 248, 263—265, 406

— F_0 206, 228— F_1 206

— фаговая инфекция 286

— флагеллярный мотор 288—290

— цитохром d 138— цитохром o 138

Ядро 10, 330

Именной указатель¹

- Абдулаев Н. Г. 25, 154, 158, 159, 170, 172, 179, 442, 449
 Ави-Дор И. (Avi-Dor Y.) 383, 384, 416
 Адлер Дж. (Adler J.) 290—292, 332, 333, 449
 Аквила Х. (Aquila H.) 265, 267, 305, 308, 309
 Ал-Марук Х. А. (Al-Mahrouq H. A.) 396, 398, 400, 416
 Алданова Н. А. 209, 217, 221, 387
 Амченкова А. А. 354—359, 450
 Анраку И. (Anraku Y.) 200, 249, 263, 450
 Аунин П. Н. Т. (Unwin P. N. T.) 154, 156, 157, 442, 449
 Аззи А. (Azzi A.) 120, 136, 138, 226
 Аццоне Дж. Ф. (Azzone G. F.) 36, 104, 271, 424
 Бакеева Л. Е. 37, 38, 41, 42, 219, 289, 340—348, 354—359, 363, 365, 393, 406, 409, 449, 450
 Баккер Э. П. (Bakker E. P.) 41, 250, 280, 371—373
 Балчешевски М. (Baltscheffsky M.) 222, 242, 245, 449
 Барский Е. Л. 33, 42, 242, 437, 438
 Берайтер-Хан Й. (Bereither-Hahn J.) 297, 350, 361
 Берг Х. К. (Berg H. C.) 289—293, 449
 Берридж М. Дж. (Berridge M. J.) 184, 409, 442
 Бёни П. (Böhni P.) 272, 273, 275, 277, 279, 283
 Бланкеншип Р. Э. (Blankenship R. E.) 82, 85—87
 Блауок А. Э. (Blaurock A. E.) 153, 161, 439, 449
 Блаут М. (Blaut M.) 145, 146, 398
 Блок М. (Block M.) 33, 266, 268, 269, 285, 304
 Богомольный Р. А. (Bogomolni R. A.) 44, 161, 162, 165, 172, 173, 176, 178, 179, 333
 Бойер П. Д. (Boyer P. D.) 72, 224, 225, 231, 233, 447
 Брандолин Дж. (Brandolin G.) 266, 268, 285, 304
 Бремер Й. (Bremer J.) 258, 259, 261
 Бретон Дж. (Breton J.) 53, 61, 65, 72
 Броун И. И. 43, 371—373, 375, 384, 416, 432, 449
 Бруммер Б. (Brummer B.) 330, 331, 413
 Бузе Г. (Buse G.) 127, 132, 134
 Булан Ф. (Bouilland F.) 305, 308, 310
 Вайс Х. (Weiss H.) 103, 111, 114, 115, 118, 119, 227, 275, 277, 279, 450
 Ван Дам К. (Van Dam K.) 33, 233, 239
 Верховская М. Л. 399, 400, 416, 450
 Викстрем М. (Wikström M.) 103—105, 109, 119—121, 123, 125, 127, 132—135, 137, 138, 141, 150, 238, 447, 449
 Виноградов А. Д. 222, 223, 232, 233
 Випье П. В. (Vignais P. V.) 224, 266, 268, 269, 285, 304, 321
 Витт Х. Т. (Witt H. T.) 42, 44, 88, 89, 176, 237, 238, 437, 449
 Вуд Т. (Wood T.) 123, 138, 376
 Гассер С. (Gasser S.) 272, 273, 275, 277, 279, 283
 Глаголев А. Н. 177, 290, 292, 295, 332, 333, 336, 371—373, 375, 393, 402, 449, 450
 Говинджи Р. (Govindjee R.) 163, 167, 172, 173, 178
 Готтшальк Г. (Gottschalk G.) 133, 144—146, 149, 398
 Гоффе А. (Goffeau A.) 198, 217, 266
 Гриниус Л. Л. 37, 38, 104, 244, 285, 286, 372, 449
 Грæбер П. (Græber P.) 44, 228, 237
 Гутман М. (Gutman M.) 102, 104, 121, 238, 376
 Гуффанти А. А. (Guffanti A. A.) 389, 392, 393, 399, 416, 450
 Дайзенхофер Й. (Deisenhofer J.) 51, 53, 61, 65, 66, 69, 71, 77, 402, 442, 450
 Данчхазы Ж. (Dancshazy Z.) 33, 163, 238, 438

- Даттон П. Л. (Dutton P. L.) 52, 53, 65, 71, 138
 Денхер Н. А. (Dencher N. A.) 163, 165, 172, 175, 176, 179, 333
 Джексон Дж. Б. (Jackson J. B.) 42, 43, 238, 306, 370, 441, 449
 Джонсон Л. В. (Johnson L. V.) 41, 328, 350
 Дибров П. А. 382, 393, 399, 400, 402, 416, 450
 Димрот П. (Dimroth P.) 379—381, 389, 394, 395, 400, 401, 416, 417, 449
 Драгота З. (Drahota Z.) 270, 308, 310
 Драчев А. Л. 170, 173, 181, 289, 371, 373, 393, 416
 Драчев Л. А. 25, 28, 29, 31, 33, 39, 43, 45, 72—75, 123, 163—167, 169—173, 181, 182, 186, 228, 244, 438, 442, 449
 Драчева С. М. 45, 72—75, 442
 Зебальд В. (Sebald W.) 111, 115, 118, 210—216, 220, 221, 225, 450
 Зоров Д. Б. 41, 42, 302, 351—359, 428, 450
 Имае И. (Imae Y.) 290, 321, 389, 393, 416, 450
 Кагава Я. (Kagawa Y.) 28, 31, 32, 124, 138, 207—209, 215, 217, 218, 223—226, 228, 237, 272, 438
 Каденбах Б. (Kadenbach B.) 125, 127, 132, 133, 218
 Казей Р. П. (Casey R. P.) 104, 120, 134, 136, 138, 447, 449
 Каламбаров Г. Р. 33, 181, 182, 186
 Каназава Г. (Kanazawa H.) 221, 225, 227, 228
 Капальди Р. А. (Capaldi R. A.) 125, 132, 136, 424
 Карафоли Э. (Carafoli E.) 25, 137, 138, 225, 270, 418
 Карпер С. У. (Carper S. W.) 396, 397, 400, 416
 Каулен А. Д. 25, 28, 29, 31, 33, 39, 45, 163—167, 169, 170, 172, 173, 181, 182, 186, 438, 442, 449
 Ке Б. (Ke B.) 86, 87, 89, 90
 Кейбек Х. Р. (Kaback H. R.) 138, 263, 264, 389, 430
 Кен-Дрор С. (Ken-Dror S.) 383, 384, 416
 Кимура Х. (Kimura H.) 158, 159, 173, 275
 Кинг Т. Э. (King T. E.) 103, 111, 118
 Кирик И. И. 43, 384, 416, 432
 Кириллова Г. П. 314, 350, 424
 Киселёв А. В. 25, 154, 158, 159, 170, 172, 442, 449
 Китада М. (Kitada M.) 389, 393, 416, 450
 Клингенберг М. (Klingenberg M.) 242, 266, 267, 280, 305, 308, 309, 448, 449
 Кобаяши Х. (Kobayashi H.) 385, 386, 393
 Кодама Т. (Kodama T.) 384, 393, 399
 Козлов И. А. 33, 195, 197, 218, 220, 221—225, 228, 231—233
 Кондрашин А. А. 27, 33, 123, 242, 244, 438, 449
 Конингс В. Н. (Konings W. N.) 255, 265, 266, 286
 Константинов А. А. 33, 72—75, 120, 121, 136, 139, 437, 442, 450
 Корана Х. Г. (Khorana H. G.) 154, 155, 158, 160, 163, 170, 171, 176, 306, 442, 449, 450
 Костырко В. А. 382, 393, 399
 Крайдер Б. П. (Crider B. P.) 396, 397, 400, 416
 Крамер В. А. (Cramer W. A.) 86, 88, 89, 91, 92—94
 Крейн Ф. Л. (Crane F. L.) 10, 203, 369
 Крёгер А. (Kröger A.) 143, 144, 209
 Кросс Р. Л. (Cross R. L.) 224, 225, 231, 447
 Крофтс Э. Р. (Crofts A. R.) 42, 44, 71, 76, 77, 90, 167, 306, 402, 449
 Крулвич Т. А. (Kulwich T. A.) 372, 373, 389, 392, 393, 399, 416, 450
 Ксие К.-С. (Xei X.-S.) 202, 203, 205
 Кунц В. С. (Kunz W. S.) 120, 121, 450
 Каннион Б. (Cannon B.) 307, 308, 312, 313
 Лазарова Р. Л. (Lazarova R. L.) 382, 393, 399, 400, 416, 450
 Лампидис Т. Дж. (Lampidis T. J.) 41, 350, 428
 Лани Я. К. (Lanyi J. K.) 33, 175, 176, 383, 384, 416, 449
 Ланкастер Дж. Р. (Lancaster J. R.) 396, 397, 400, 416
 Ларди Г. А. (Lardy H. A.) 305, 338, 448, 449
 Левинский Д. О. 37, 38, 259, 449
 Ленинджер А. Л. (Lehninger A. L.) 100, 104, 250, 314, 338, 423, 429, 433, 435, 448, 449
 Леонард К. (Leonard K.) 115, 119, 275, 450

Ли И. (Li Y.) 115, 119, 275, 450
 Ли С.-П. (Lee C.-P.) 142, 245, 246, 323
 Ли С.-Х. (Lee S.-H.) 203, 389, 390, 418
 Либерман Е. А. 37, 38, 104, 120, 142, 242, 244, 369, 428, 435, 437, 438, 448, 449
 Линк Т. А. (Link T. A.) 111, 120, 305, 308, 309
 Лишко А. П. 199, 200, 450
 Лозьер Р. Х. (Lozier R. H.) 44, 161, 162, 165, 173
 Локк Р. М. (Locke R. M.) 305, 308, 310, 312, 313, 392
 Локан Г. Ж. М. (Lauquin G. J. M.) 266, 268, 269, 285, 304
 Лоттспайх Ф. (Lottspeich F.) 51, 53, 55, 450

Макнаб Р. М. (Macnab R. M.) 289, 290, 291, 390, 392
 Марин Б. (Marin B.) 199, 200, 388
 Марра Е. (Marra E.) 198, 199, 275, 283
 Маслов С. П. 97, 301, 302, 313, 314, 319, 448
 Мацубара Х. (Matsubara H.) 111, 118, 278
 Мерфи Д. Дж. (Murphy D. J.) 86, 89, 90
 Метлина А. Л. 289, 290, 393, 406, 409
 Милейковская Е. И. 33, 195, 197, 222
 Митчелл П. (Mitchell P.) 36, 44, 75, 77, 104, 120, 121, 134, 136, 139, 229, 231, 235, 237, 243, 245, 263, 271, 290, 292, 370, 371, 404, 433, 435, 436, 442, 448, 449
 Митчелл Р. (Mitchell R.) 104, 134, 136, 139
 Модянов Н. Н. 209, 217, 221, 387
 Мойл Дж. (Moyle J.) 36, 44, 104, 231, 245, 436
 Мохова Е. Н. 302, 314, 320, 326, 350, 424
 Мууди Э. Дж. (Moody A. J.) 134, 136, 139
 Мэнсон М. Д. (Manson M. D.) 289, 290, 291, 293, 449

Набиев И. Р. 156, 160, 172
 Нельсон Б. Д. (Nelson B. D.) 9, 23, 110, 111, 119, 178, 201
 Нельсон Н. (Nelson N.) 28, 51, 61, 70, 71, 81, 82, 86—89, 163, 202, 203, 218, 226, 227, 275, 279, 449

Немечек И. Б. 28, 33, 228, 438, 449
 Никольс Д. Дж. (Nicholls D. G.) 26, 199, 306, 308, 310, 312, 313, 326, 327, 392, 449
 Нойперт В. (Neupert W.) 275, 277, 279, 283, 285
 Овчинников Ю. А. 25, 154, 155, 157—159, 170, 172, 179, 181, 209, 217, 221, 262, 387, 442, 449
 Окамура М. И. (Okamura M. Y.) 51, 61, 70, 71, 81, 82, 86, 87, 89
 О कोरोков Л. А. 199, 200, 450
 Оishi Т. (Ohnishi T.) 103, 108, 126, 132, 423
 Остерхельт Д. (Oesterheldt D.) 152, 153, 162, 163, 173, 176, 177, 179, 372, 439, 449, 450
 Островский Д. Н. 195, 197, 222
 Островский М. А. 33, 181, 182, 186
 Остроумов С. А. 33, 242, 437, 438, 449

Панов А. В. 269, 305, 329
 Париш Р. У. (Parish R. W.) 330, 331, 413
 Парсон У. У. (Parson W. W.) 50, 65, 69, 87, 169
 Педерсен П. Л. (Pedersen P. L.) 23, 207, 222, 256, 257, 270, 271, 400, 426
 Пеневски Х. С. (Penefsky H. S.) 222, 224, 448
 Пенттила Т. (Penttila T.) 123, 125, 127, 133, 134, 137, 141
 Перски Х.-И. (Perski H.-J.) 171, 251, 396, 398, 416
 Прессман Б. К. (Pressman B. C.) 305, 436, 448, 449
 Пул Р. (Poole R.) 124, 125, 138, 147, 149, 199, 243, 392

Ракер Э. (Racker E.) 28, 35, 104, 110, 205, 215, 218, 220, 228, 438, 440, 448, 449
 Рансуик М. Дж. (Runswick M. J.) 207, 209—218, 221, 224, 450
 Рейган К. А. (Ragan C. I.) 102—104, 108, 110
 Рикье Д. (Ricquier D.) 305, 308, 310
 Рич Б. П. (Rich P. R.) 49, 76, 77, 94, 120—122, 317
 Розен Б. П. (Rosen B. P.) 221, 390, 407, 418
 Розенберг Л. Е. (Rosenberg L. E.) 275, 279, 285
 Роттенберг Х. (Rottenberg H.) 36, 39, 44, 104, 241, 266, 280

Рэйт К. (Wraight C.) 65, 71, 90
 Сайдон С. (Cidon S.) 28, 201, 203, 449
 Сакс Дж. (Sachs G.) 203—205
 Самуилов В. Д. 33, 37, 42, 43, 72, 81, 142, 242, 437, 438, 449
 Саммерхейес И. К. (Summerhayes I. C.) 41, 350, 428
 Сарасте М. (Saraste M.) 91, 103, 105, 109, 111, 112, 114, 119, 120, 123, 125, 127, 132—135, 137, 138, 141, 150, 207, 209—218, 221, 450
 Северин С. Е. 259, 331, 375, 377
 Северина И. И. 28, 29, 33, 37—39, 41, 43, 123, 228, 244, 336, 350, 351, 384, 428, 432, 438, 449
 Семенов А. Ю. 28, 33, 39, 43, 72—75, 123, 228, 244, 438, 442
 Слейтер Э. К. (Slater E. C.) 108, 121, 240, 245
 Смирнова И. А. 33, 382, 393, 399, 437, 439, 449
 Смит Р. Е. (Smith R. E.) 305, 306, 308, 312
 Смит С. (Smith S.) 102—104, 163—165, 174
 Соне Н. (Sone N.) 31, 32, 124, 125, 137, 138, 225
 Стокениус У. (Stoeckenius W.) 152, 153, 158—163, 165, 173, 174, 176, 179, 228, 377, 439, 440, 449
 Стриттматтер П. (Strittmatter P.) 24, 26, 366, 367
 Стахелин Л. А. (Stachelin L. A.) 333, 335, 336, 388

Тиде Д. М. (Tiede D. M.) 33, 53, 65
 Тихонова Г. В. 33, 148, 195, 197
 Токуда Х. (Tokuda H.) 381—383, 388, 389, 416, 450
 Томер А. (Thomer A.) 380, 389, 416
 Топалы В. П. 37, 38, 104, 244, 428, 435, 437, 449
 Тройбле Х. (Träuble H.) 203, 362, 365

Уиджер У. Р. (Widger W. R.) 86, 88, 89, 91—94
 Уилсон Т. Х. (Wilson T. H.) 135, 202, 203, 263, 286, 372, 389, 400
 Уинклер Х. (Winkler H.) 201, 203, 270
 Унемото Т. (Unemoto T.) 381—386, 389, 416, 450
 Уолкер Дж. И. (Walker J. E.) 207, 209—218, 221, 224, 450

Уэлш М. Л. (Walsh M. L.) 41, 328, 350
 Уэст И. К. (West I. C.) 104, 134, 136, 139, 263, 371, 390, 426

Фейгина М. Ю. 25, 154, 158, 170, 442, 449
 Фелдман Р. А. (Feldman R. I.) 224, 233, 450
 Фергусон С. Дж. (Ferguson S. J.) 110, 238, 411
 Фиер Дж. (Feher G.) 51, 61, 70, 71, 81, 82, 86, 87, 89
 Фон Мейенбург К. (Von Meyenburg K.) 208, 221, 225
 Френкель Г. (Fraenkel G.) 144, 256, 258
 Футан М. (Futai M.) 221, 225, 227, 228

Хамамото Т. (Hamamoto T.) 31, 32, 138, 225, 237
 Хан С. (Khan S.) 290, 291, 292
 Харольд Ф. М. (Harold F. M.) 145, 197, 251, 290, 370, 371, 385, 394, 416, 437, 438, 449
 Хатефи Ю. (Hatefy Y.) 103, 236, 245, 448
 Хауска Г. А. (Hauska G. A.) 42, 88, 237
 Хаяши М. (Hayashi M.) 381—384
 Хендерсон Р. (Henderson R.) 63, 154, 156, 157, 160, 161, 418, 442, 449
 Херрман Р. Г. (Herrmann R. G.) 86, 88, 89, 91—94, 209, 217, 218, 417

Хесс Б. (Hess B.) 158, 169, 172, 173, 179
 Хилперт У. (Hilpert W.) 380, 381, 384, 395, 400, 416
 Хинкль П. К. (Hinkle P. C.) 28, 104, 108, 110, 138, 141, 150, 438, 449
 Хирога Н. (Hirota N.) 393, 416, 450
 Хитрина Л. В. 25, 29, 170, 173
 Хоппе И. (Hoppe J.) 210—216, 220, 221, 225, 450
 Хубер Р. (Huber R.) 51, 53, 61, 63, 65, 66, 69, 71, 77, 402, 442, 450

Цофина Л. М. 37, 38, 43, 120, 142, 242, 244, 428, 437, 449
 Цушия Т. (Tsuchiya T.) 372, 383, 389

Чанг К.-Х. (Chang C.-H.) 171—173, 178

- Чанс Б. (Chance B.) 135, 332, 424, 448
 Чен Л. Б. (Chen L. B.) 41, 284, 328, 350, 428
 Ченцов Ю. С. 340—348, 354—359, 363, 365, 450
 Черняк Б. В. 222, 223, 233, 393, 450
 Чумаков К. М. 289, 393, 406—409
 Шац Г. (Schatz G.) 104, 201, 272, 275, 277—279
 Шеберт Б. (Schöbert B.) 175, 383, 384, 416, 449
 Шенхайдт П. (Schönheit P.) 251, 396, 398, 416
 Шерман М. Ю. 333, 334, 393, 450
 Шпротт Г. Д. (Sprott G. D.) 146, 374, 383, 398
 Шувалов В. А. 50, 65, 68, 69, 73—75, 79, 86, 442
 Эбри Т. (Ebrey T.) 44, 163, 167, 172, 173, 178
 Эванс М. К. У. (Evans M. C. W.) 87, 89, 332
 Энгельгард М. (Enghelhard M.) 158, 169, 172, 173
 Эпштейн В. (Epstein W.) 251, 371, 417
 Эрнстер Л. (Ernster L.) 138, 209, 217, 221, 243, 245, 246, 424, 425, 428
 Юнге В. (Junge W.) 42, 176, 226, 238, 376, 449
 Ягужинский Л. С. 259, 323, 328, 345, 435
 Ясайтис А. А. 28, 33, 37, 38, 104, 123, 228, 286, 320, 428, 435, 437—439, 449

Оглавление

Предисловие	3
Список сокращений	5
Глава 1. Введение в мембранную биоэнергетику	6
1.1. Биоэнергетика в системе биологических наук	6
1.2. Определение основных понятий	8
1.2.1. Мембраны с точки зрения биоэнергетика	8
1.2.2. Сопрягающие ионы	10
1.2.3. Конвертируемые энергетические «валюты» живой клетки	12
1.3. $\Delta\mu\text{H}$, $\Delta\mu$, $\Delta\mu\text{Na}$ и Δs	14
1.4. Аденозинтрифосфат	15
1.5. Липидный компонент биомембран	19
1.6. Липидный бислой	22
1.7. Мембранные белки	23
Глава 2. Специфические методы мембранной биоэнергетики	27
2.1. Измерение мембранного потенциала ($\Delta\psi$)	27
2.1.1. Протеолипосомы	28
2.1.2. Прямое измерение генерации $\Delta\psi$ протеолипосомами, сорбированными на коллоидной пленке	29
2.1.3. Измерение $\Delta\psi$ в интактных клетках и органеллах	34
2.1.3.1. Микроэлектродный метод	34
2.1.3.2. Природные проникающие ионы и ионофоры	36
2.1.3.3. Синтетические проникающие ионы	37
2.1.3.4. Флюоресцирующие проникающие ионы: наблюдение за $\Delta\psi$ в отдельной клетке и органелле	41
2.1.3.5. Каротиноидный сдвиг	42
2.2. Измерение ΔpH	43
2.3. Измерение быстрых процессов протонирования—депротонирования	45
Глава 3. Первичные $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы	47
3.1. Циклическая светозависимая редокс-цепь фотосинтезирующих бактерий	47
3.1.1. Основные компоненты и принцип их действия	47
3.1.2. Комплекс реакционных центров	51
3.1.2.1. Белковый состав	51
3.1.2.2. Расположение редокс-групп	54
3.1.2.3. Последовательность реакций переноса электронов	67
3.1.2.4. Механизм генерации $\Delta\mu\text{H}$	71
3.1.3. СоQ-цитохром с-редуктаза	76
3.1.4. Пути использования $\Delta\mu\text{H}$, образованной циклической редокс-цепью	77

3.2. Нециклическая светозависимая редокс-цепь зеленых бактерий	79
3.3. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов и цианобактерий	82
3.3.1. Принцип действия	83
3.3.2. Фотосистема I	86
3.3.2.1. Субъединичный состав	86
3.3.2.2. Механизм переноса электронов	86
3.3.2.3. Механизм генерации $\Delta\bar{p}H$	88
3.3.3. Фотосистема II	88
3.3.4. PQH_2 -пластоцианин-редуктаза	90
3.3.5. Судьба $\Delta\bar{p}H$, образованной фотосинтетической редокс-цепью хлоропластов	95
3.4. Дыхательная цепь	97
3.4.1. Принцип действия	97
3.4.2. Источники восстановительных эквивалентов	100
3.4.3. $NADH-CoQ$ -редуктаза	102
3.4.3.1. Белковый состав и редокс-центры	102
3.4.3.2. Доказательство $\Delta\bar{p}H$ -генерирующей способности $NADH-CoQ$ -редуктазы	104
3.4.3.3. Возможные механизмы генерации $\Delta\bar{p}H$	104
3.4.4. $CoQH_2$ -цитохром c -редуктаза	110
3.4.4.1. Структурные аспекты	110
3.4.4.2. Функциональная модель	119
3.4.4.3. Взаимосвязь с $CoQH_2(PQH_2)$ -цитохром c -редуктазами бактериальных фотосинтетических цепей	122
3.4.5. Цитохромоксидаза	123
3.4.5.1. Цитохром c	123
3.4.5.2. Структура цитохромоксидазы	124
3.4.5.3. Путь переноса электронов	133
3.4.5.4. Механизм генерации $\Delta\bar{p}H$	134
3.4.6. Три цикла в дыхательной цепи	139
3.4.7. Укороченные дыхательные цепи, генерирующие $\Delta\bar{p}H$	142
3.4.7.1. Восстановление нитрата	142
3.4.7.2. Восстановление фумарата	143
3.4.7.3. Метаногенез	145
3.4.7.4. Окисление субстратов с положительным редокс-потенциалом	147
3.4.8. Пути и эффективность использования $\Delta\bar{p}H$, образуемой дыхательной цепью. Отношение P/O	149
3.5. Бактериородопсин	152
3.5.1. Принцип действия	152
3.5.2. Структура бактериородопсина	154
3.5.3. Липиды бактериородопсиновых бляшек	160
3.5.4. Организация бактериородопсиновой бляшки	161
3.5.5. Фотоцикл бактериородопсина	162

3.5.6. Светозависимый транспорт протонов бактериородопсином	165
3.5.6.1. Корреляция фотоцикла, генерации $\Delta\bar{p}H$, освобождения и поглощения H^+	165
3.5.6.2. Возможный механизм перекачки протонов	167
3.5.7. Бактериородопсин в темноте. Проблема утечки протонов	174
3.5.8. Другие ретинальсодержащие белки	175
3.5.8.1. Галлородопсин	175
3.5.8.2. Сенсорный родопсин и фобородопсин галобактерий	177
3.5.8.3. Животный родопсин	179
3.6. Первичные $\Delta\bar{p}H$ -генераторы: заключение	188
3.6.1. Количество типов $\Delta\bar{p}H$ -генераторов в различных видах живых систем	188
3.6.2. Соотношение процессов переноса протонов и электронов в механизмах, генерирующих $\Delta\bar{p}H$	191
Глава 4. H^+-АТРАЗЫ — вторичные $\Delta\bar{p}H$-генераторы	193
4.1. Определение и классификация	193
4.2. H^+ -АТРаза облигатно анаэробных бактерий	195
4.3. H^+ -АТРаза внешней клеточной мембраны растений и грибов	197
4.4. H^+ -АТРаза тонопласта	199
4.5. Немитохондриальные H^+ -АТРАЗЫ животных клеток	201
4.5.1. H^+ -АТРаза хромаффинных гранул	201
4.5.2. Другие H^+ -АТРАЗЫ	202
4.5.3. H^+/K^+ -АТРаза слизистой желудка	203
4.6. Соотношение функций H^+ -АТРАЗ	205
Глава 5. Потребители $\Delta\bar{p}H$	207
5.1. Химическая работа за счет $\Delta\bar{p}H$	207
5.1.1. H^+ -АТР-синтаза	207
5.1.1.1. Субъединичное строение	207
5.1.1.2. Трехмерная структура и расположение в мембране	218
5.1.1.3. Гидролиз АТР изолированным фактором F_1	221
5.1.1.4. Синтез связанного АТР изолированным фактором F_1	224
5.1.1.5. Проведение протонов через фактор F_0	225
5.1.1.6. Взаимопревращение $\Delta\bar{p}H \leftrightarrow ATR$, катализируемое H^+ -АТР-синтазой в протеолипосомах	228
5.1.1.7. Стехиометрия H^+/ATR	229
5.1.1.8. Возможные механизмы превращения энергии	230
5.1.1.9. Может ли локальная $\Delta\bar{p}H$ участвовать в синтезе АТР?	237
5.1.2. H^+ -пирофосфатсинтаза	242
5.1.3. H^+ -трансгидрогеназа	243
5.1.3.1. Общая характеристика	243
5.1.3.2. Механизм превращения энергии	244

5.1.3.3. Биологические функции	246
5.1.3.4. Другие системы обратного переноса восстановительных эквивалентов	247
5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\mu\text{H}$	248
5.2.1. Определение и классификация	248
5.2.2. $\Delta\Psi$ как движущая сила	249
5.2.3. $\Delta\mu\text{H}$ как движущая сила	252
5.2.4. Общая $\Delta\mu\text{H}$ как движущая сила	254
5.2.5. $\Delta\mu\text{H}$ -зависимые транспортные каскады	255
5.2.6. Карнитин как пример трансмембранного переносчика химической группировки	256
5.2.7. Некоторые примеры $\Delta\mu\text{H}$ -зависимых белков-переносчиков	261
5.2.7.1. Лактоза, H^+ -симпортер из <i>E. coli</i>	263
5.2.7.2. Митохондриальный АТР/АДР-антипортер	266
5.2.7.3. Митохондриальный H_2PO_4^- , H^+ -симпортер	270
5.2.8. Роль $\Delta\mu\text{H}$ в транспорте макромолекул	271
5.2.8.1. Транспорт митохондриальных белков. Биогенез митохондрий	272
5.2.8.2. Транспорт бактериальных белков	280
5.2.8.3. Роль $\Delta\mu\text{H}$ в транспорте белков и их укладке в мембране	281
5.2.8.4. Транспорт бактериальной ДНК	285
5.3. Механическая работа за счет $\Delta\mu\text{H}$: движение бактерий	287
5.3.1. Структура флагалярного мотора бактерий	290
5.3.2. $\Delta\mu\text{H}$ вращает ротор флагалярного мотора	292
5.3.3. Возможный механизм H^+ -мотора	295
5.3.4. $\Delta\mu\text{H}$ -зависимая подвижность не содержащих флагелл прокариот и внутриклеточных органелл	298
5.3.5. Подвижные симбионты эукариот и прокариот	300
5.4. $\Delta\mu\text{H}$ как источник энергии для образования тепла	300
5.4.1. Три способа превращения метаболической энергии в тепло	301
5.4.2. Терморегуляторная активация свободного дыхания у животных	307
5.4.2.1. Скелетные мышцы	307
5.4.2.2. Бурый жир	313
5.4.2.3. Печень	315
5.4.3. Терморегуляторная активация свободного окисления у растений	315
Глава 6. Регуляция, транспорт и стабилизация протонного потенциала	319
6.1. Регуляция $\Delta\mu\text{H}$	319
6.1.1. Альтернативные функции дыхания	319
6.1.2. Регуляция потоков восстановительных эквивалентов между цитозолем и митохондриями	325
6.1.3. Взаимопревращение $\Delta\Psi$ и $\Delta\mu\text{H}$	328

6.1.4. Отношение системы контроля $\Delta\mu\text{H}$ к основным регуляторным механизмам эукариот	329
6.1.5. Контроль $\Delta\mu\text{H}$ у бактерий	331
6.2. Транспорт энергии вдоль мембран в форме $\Delta\mu\text{H}$	334
6.2.1. Общие положения	334
6.2.2. Перенос $\Delta\mu\text{H}$, образуемой светозависимыми $\Delta\mu\text{H}$ -генераторами, вдоль мембран галобактерий и хлоропластов	335
6.2.3. Трансклеточный перенос энергии в трихомах цианобактерий	336
6.2.4. Структура и свойства нитчатых митохондрий и митохондриального ретикулума	337
6.2.4.1. Догма о мелких митохондриях	337
6.2.4.2. Гигантские митохондрии и Reticulum mitochondriale	338
6.2.4.3. Нитчатые митохондрии	347
6.2.4.4. Митохондрии как внутриклеточные протонные кабели: доказательство гипотезы	353
6.2.4.5. Возможный механизм передачи $\Delta\mu\text{H}$ вдоль мембран	355
6.2.4.6. Гигантские митохондрии как пути транспорта Ca^{2+} , жирных кислот и кислорода	361
6.2.4.7. Перенос восстановительных эквивалентов вдоль мембран	365
6.2.4.8. Цитохром b_5 как межмембранный переносчик электронов	367
6.3. $\Delta\mu\text{H}$ -буферы	370
6.3.1. Градиенты Na^+ и K^+ как $\Delta\mu\text{H}$ -буфер у бактерий	370
6.3.2. Другие системы стабилизации $\Delta\mu\text{H}$	374
6.3.3. Карнозин и ансерин как специализированные рН-буферы	375
Глава 7. Натриевый мир	379
7.1. Генераторы $\Delta\mu\text{Na}$	379
7.1.1. Декарбоксилазы, транспортирующие Na^+	379
7.1.2. Na^+ -транспортирующая дыхательная цепь	381
7.1.3. Na^+ -транспортирующие АТРАЗы	385
7.1.3.1. Бактериальные Na^+ -АТРАЗы	385
7.1.3.2. Na^+/K^+ -АТРаза и Na^+ -АТРаза животных	386
7.2. Утилизация $\Delta\mu\text{Na}$, образуемой первичными $\Delta\mu\text{H}$ -генераторами	388
7.2.1. Осмотическая работа	388
7.2.1.1. Na^+ , метаболит-симпортеры	388
7.2.1.2. Ионы Na^+ и регуляция внутриклеточного рН	390
7.2.2. Механическая работа	393
7.2.3. Химическая работа	394
7.2.3.1. $\Delta\mu\text{Na}$ -зависимый синтез АТР у анаэробных бактерий	394
7.2.3.2. «Натриевое» дыхательное фосфорилирование у <i>V. alginolyticus</i>	399
7.3. Как часто используется Na^+ -цикл живыми клетками?	402

7.4. Возможные эволюционные отношения между протонным и натриевым миром.	404
7.5. Na^+/H^+ -антипорт и роль H^+ как внутриклеточного посредника в животной клетке	409
7.6. Общая схема соотношений протонного и натриевого циклов	413
7.7. Превращение энергии в биомембранах без участия H^+ и Na^+	417
Глава 8. Мембранная биоэнергетика: некоторые итоги и перспективы	420
8.1. Фундаментальные исследования	420
8.2. На пути к прикладной биоэнергетике	423
8.2.1. Медицинские аспекты	423
8.2.1.1. Дефекты дыхательной цепи	423
8.2.1.2. Рак: роль Na^+/H^+ -антипортера	426
8.2.1.3. Рак: противоопухолевое действие проникающих катионов	428
8.2.1.4. Действие антимикробных агентов, направленное на системы мембранной энергетики	429
8.2.2. Два примера возможного технологического применения мембранной биоэнергетики	431
8.2.2.1. Регенерация АТР за счет энергии света	431
8.2.2.2. Натриевый цикл у полезных бактерий	432
Глава 9. Исторический очерк исследований по энергетике биомембран	433
9.1. Первые идеи и наблюдения. Хемосмотическая гипотеза	433
9.2. Разобщители	435
9.3. $\Delta\mu\text{H}$ на природных мембранах	436
9.4. $\Delta\mu\text{H}$ на реконструированных мембранах	437
9.5. Образование АТР за счет искусственно созданной $\Delta\mu\text{H}$	438
9.6. Бактериородопсин и химерные протеолипосомы	439
9.7. Новейшая история	440
Хронология мембранной биоэнергетики: важнейшие открытия предшествовавшие появлению этой отрасли биологии, и главные вехи ее развития	448
Список литературы	451
Предметный указатель	539
Именной указатель	553

Научное издание

Скулачев Владимир Петрович
Энергетика биологических мембран

Утверждено к печати
 Секцией химико-технологических
 и биологических наук АН СССР

Редактор О. Л. Оболонская
 Художественный редактор В. В. Алексеев
 Технический редактор Н. Н. Плохова
 Корректоры Н. Г. Васильева, Р. В. Молоканова

ИБ № 37597

Сдано в набор 03.10.88
 Подписано к печати 17.01.89
 Т-00225. Формат 60×90^{1/16}
 Бумага типографская № 1
 Гарнитура обыкновенная
 Печать высокая
 Усл. печ. л. 35,5. Усл. кр. отт. 35,5. Уч.-изд. л. 41,0
 Тираж 2100 экз. Тип. зак. 2198
 Цена 7 р. 50 к.

Ордена Трудового Красного Знамени
 издательство «Наука»
 117864, ГСП-7, Москва, В-485,
 Профсоюзная ул., 90

2-я типография издательства «Наука»
 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ
«НАУКА»
ГОТОВЯТСЯ К ПЕЧАТИ

**Вавиловское наследие
в современной биологии**
5 р. 60 к.

Предлагаемая читателю книга завершает издание юбилейной серии, посвященной 100-летию со дня рождения Николая Ивановича Вавилова. В нее вошли статьи советских и зарубежных ученых, в которых развиваются основные концепции, идеи и обобщения выдающегося советского ученого, предпринята попытка осветить творческое наследие Н. И. Вавилова в фокусе новейших достижений и проблем современной биологии, прежде всего генетики и селекции. Впервые публикуется полная стенограмма последнего отчета о деятельности Института генетики АН СССР за 1939 г., с которым выступил Н. И. Вавилов на заседании Отделения биологических наук АН СССР. Для генетиков, селекционеров, ботаников, археологов, этнографов и тех, кто интересуется историей естествознания.

Воспоминания о В. А. Энгельгардте
3 р. 80 к.

Книга представляет собой сборник воспоминаний видных ученых, учеников и сотрудников, контактировавших с Владимиром Александровичем Энгельгардтом в различные периоды его жизни и творчества. В издание включены также письма В. А. Энгельгардту и богатый иллюстративный материал. Целью книги является сохранение в памяти людей образа академика В. А. Энгельгардта как Гражданина, Ученого, Человека. Для биологов, химиков, историков науки.

Георгиев Г. П.
**Гены высших организмов
и их экспрессия**
90 к.

В монографии излагаются вопросы структурной организации генетического аппарата эукариот, структуры хроматина, регуляции экспрессии генов, организации ядерных рибонуклеопротеидов, процессинга РНК. Для биологов широкого профиля.

Морозов Ю. В., Бажулина Н. П.
**Электронное строение, спектроскопия
и реакционная способность молекул:
Нуклеиновые основания, витамины В₆
и их аналоги**
3 р. 80 к.

Книга посвящена описанию экспериментально-теоретического подхода к изучению физико-химических свойств органических соединений и реализации такого подхода на примере трех классов соединений: производных 3-оксипиридина, пиримидинов и пуринов. Смысл нового подхода заключается в сочетании методов квантовой химии, спектроскопии (абсорбционной и люминесцентной) и математической обработки спектроскопической информации. Для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов.